



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO  
PROSTŘEDÍ**

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

**STANOVENÍ MAKROLIDŮ V ODPADNÍCH VODÁCH V  
PRŮBĚHU TECHNOLOGIÍ APLIKOVANÝCH NA  
ČISTÍRNÁCH ODPADNÍCH VOD**

DETERMINATION OF MACROLIDES IN WASTEWATER DURING THE TECHNOLOGY APPLIED TO  
WASTEWATER TREATMENT PLANTS

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Pavlína Landová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.**

**BRNO 2016**



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0955/2015</b>	Akademický rok: <b>2015/2016</b>
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	<b>Bc. Pavlína Landová</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	<b>prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.</b>	
Konzultanti:		

### Název diplomové práce:

Stanovení makrolidů v odpadních vodách v průběhu technologií aplikovaných na čistírnách odpadních vod

### Zadání diplomové práce:

Na základě provedené rešerše budou vybrána léčiva, a to makrolidová antibiotika.

Bude sledována jejich distribuce do odpadních vod v různých čistírnách odpadních vod (s různým počtem EO), a to během celého čistícího procesu.

Získané výsledky budou interpretovány.

### Termín odevzdání diplomové práce: 19.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Pavlína Landová  
Student(ka)

-----  
prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce je zaměřena na stanovení makrolidových antibiotik v odpadních vodách. Kontaminace životního prostředí léčivy představuje v současnosti velký problém. Ke zjištění úrovně této kontaminace je nezbytný vývoj vhodných analytických technik. Ze skupiny makrolidových antibiotik byly vybrány čtyři zástupci, a to erythromycin, klarithromycin, azithromycin a roxithromycin, které patří v České republice k nejvíce aplikovaným. Pro jejich izolaci z odpadní vody byla zvolena extrakce tuhou fází a jako finální metoda pro identifikaci a kvantifikaci vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Za optimalizovaných podmínek bylo provedeno desetidenní sledování přítoku a odtoku na ČOV Brno-Modřice, dvoudenní a jednodenní sledování přítoku a odtoku na ČOV Mikulov respektive ČOV Veterinární a farmaceutické univerzity Brno.

## **ABSTRACT**

Diploma thesis is focused on determination of macrolide antibiotics in wastewater. Environmental contamination with drugs currently represents a major problem. To determine the level of contamination is necessary to develop the appropriate analytical techniques. From the group of macrolide antibiotics were selected four representatives: erythromycin, clarithromycin, azithromycin and roxithromycin due to their frequent use in Czech Republic. For their isolation from wastewater was selected solid phase extraction and for analysis high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection was chosen. Under optimized conditions, the ten days analysis of wastewater from the WWTP Brno-Modřice, two days analysis of wastewater from the WWTP Mikulov and one day analysis of wastewater from WWTP of University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno was performed.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

makrolidová antibiotika, odpadní voda, extrakce tuhou fází, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, elektrospoj

## **KEYWORDS**

macrolide antibiotics, wastewater, solid phase extraction, high performance liquid chromatography, mass spectrometry, electrospray

LANDOVÁ, P. *Stanovení makrolidů v odpadních vodách v průběhu technologií aplikovaných na čistírnách odpadních vod*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 91 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

*Ráda bych na tomto místě poděkovala paní prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za odborné vedení a cenné rady. Dále pak děkuji všem z ÚCHTOŽP, kteří mi při řešení diplomové práce vždy ochotně pomohli. V neposlední řadě patří velké díky mamince a tatínkovi, kteří mi celé studium umožnili, podporovali mě a věřili, že jsem se vydala správnou cestou.*

# OBSAH

1. ÚVOD .....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1. Léčiva .....	8
2.1.1. Definice pojmů .....	8
2.1.2. Historie antibiotik .....	8
2.1.3. Antibiotika .....	9
2.1.4. Rozdělení antibiotik .....	10
2.1.5. Problematika rezistence .....	12
2.1.6. Farmakokinetika léčiv .....	14
2.1.7. Farmakodynamika .....	17
2.1.8. Cyklus antibiotik v životním prostředí a jejich osud na čistírnách odpadních vod .....	17
2.1.9. Technologie čištění odpadních vod .....	19
2.2. Makrolidová antibiotika .....	21
2.2.1. Charakteristika vybraných makrolidů .....	23
2.3. Metody stanovení makrolidů ve vodách .....	27
2.3.1. Vzorkování .....	27
2.3.2. Úprava vzorku odpadní vody před analýzou .....	28
2.4. Chromatografie .....	32
2.4.1. Plynová chromatografie .....	33
2.4.2. Kapalinová chromatografie .....	33
2.4.3. HPLC .....	33
2.4.4. Detektory v HPLC .....	37
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	44
3.1. Přístroje a pomůcky .....	44
3.2. Používaný software pro zpracování dat .....	44
3.3. Použité chemikálie a standardy .....	45
3.3.1. Chemikálie .....	45
3.3.2. Plyny .....	45
3.3.3. Standardy .....	45
3.4. Sledovaná matrice .....	45
3.4.1. Technologická specifikace ČOV VFU Brno .....	45
3.4.2. Technologická specifikace ČOV Brno - Modřice .....	45

3.4.3. Technologická specifikace ČOV Mikulov .....	46
3.5. Postup stanovení .....	47
3.5.1. Odběry vzorků.....	47
3.5.2. Úprava vzorku před izolací sledovaných analytů .....	47
3.5.3. Izolace sledovaného analytu .....	48
3.5.4. Identifikace a kvantifikace analytu .....	49
4. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	50
4.1. Určení sledované charakteristické hmoty pro jednotlivé analyty .....	50
4.2. Optimalizace chromatografických podmínek .....	52
4.2.1. Výběr vhodné kolony .....	52
4.3. Optimalizace SPE extrakce.....	57
4.3.1. Kalibrační přímka .....	57
4.3.2. Výběr vhodného druhu kolony a pracovního postupu .....	58
4.3.3. Modifikace postupu pro kolony Supel Select HLB 200 mg/6 ml.....	59
4.3.4. Statistické vyhodnocení .....	60
4.3.5. Matriční efekt .....	62
4.4. Reálné vzorky .....	63
4.4.1. ČOV VFU Brno .....	64
4.4.2. ČOV Mikulov.....	65
4.4.3. ČOV Brno-Modřice.....	67
4.4.4. Metabolity klarithromycinu .....	71
5. ZÁVĚR .....	72
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	73
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK a SYMBOLŮ .....	82
8. SEZNAM PŘÍLOH .....	83

## 1. ÚVOD

Antibiotika jsou léčiva, která jsou používána k léčbě onemocnění způsobených mikroorganismy. Jsou aplikována jak v humánní tak i veterinární medicíně. Jejich působení na určité druhy bakterií je do značné míry selektivní a vhodný výběr antibiotika potom určuje jeho účinnost. Pro účinnou terapii je proto zapotřebí znát konkrétního původce onemocnění. Často dochází k chybným diagnózám, při kterých jsou antibiotika předepsána nevhodně nebo zbytečně. Ve veterinární medicíně mohou navíc sloužit i jako promotory růstu hospodářských zvířat. Po podání jsou léčiva vylučována z organismu ve formě metabolitů nebo v jejich nezměněné podobě. Poté se dostávají do odpadních vod a následně na čistírny odpadních vod, kde současné technologické postupy nejsou schopny tyto látky z vody odstranit. Antibiotika navíc mohou negativně ovlivňovat biologický stupeň čištění, kde působí toxicky na přirozeně se zde vyskytující mikroorganismy, nezbytné ke správné funkci čistícího procesu. Čistírny odpadních vod se tak stávají významnými bodovými zdroji těchto kontaminantů. Jejich následný výskyt v povrchových vodách může působit negativně na akvatické organismy. Jsou známy i případy výskytu antibiotik ve vodách pitných. Vznik bakteriální rezistence představuje v současnosti nemalý problém, protože životní cyklus bakterií je relativně krátký a proto i vývoj mutací, které mají za následek odolnost bakterie proti konkrétnímu antibiotiku, je procesem rychlým. Na druhou stranu vývoj nových antibiotik je záležitostí roků nebo celých desetiletí.

K určení míry kontaminace těchto látek v životním prostředí je nezbytný vývoj vhodných analytických metod. Pro tyto účely jsou nejčastěji používány vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí za použití elektrospreje jako ionizační techniky. Nicméně nízké koncentrace těchto látek v životním prostředí způsobují, že jejich identifikace a kvantifikace nelze provést přímo. Proto je před samotnou analytickou koncovkou zařazován krok extrakce, rovněž patřící mezi separační techniky. V současnosti je často používána metoda extrakce tuhou fází, která přináší možnost izolace a zakoncentrování cílových analytů.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Léčiva

#### 2.1.1. Definice pojmů

Podrobně definuje termíny léčivý přípravek a léčivá látka zákon č.378/2007 Sb. o léčivech.

##### *Léčivý přípravek*

Léčivým přípravkem se rozumí látka, případně kombinace látek prezentována s tím, že má léčebné nebo preventivní vlastnosti v případě onemocnění lidí nebo zvířat. Dále je to látka nebo kombinace látek, kterou lze použít u lidí nebo podat lidem, nebo použít u zvířat nebo podat zvířatům, a to buď za účelem obnovy, úpravy nebo ovlivnění fyziologických funkcí prostřednictvím farmakologického, imunologického nebo metabolického účinku, nebo za účelem stanovení lékařské diagnózy [1]. Léčivý přípravek většinou obsahuje pomocné látky, které nemají vlastní léčebný účinek, ale slouží např. jako plnidla nebo mohou kladně ovlivňovat biologickou dostupnost přítomných účinných látek [2].

##### *Léčivá látka*

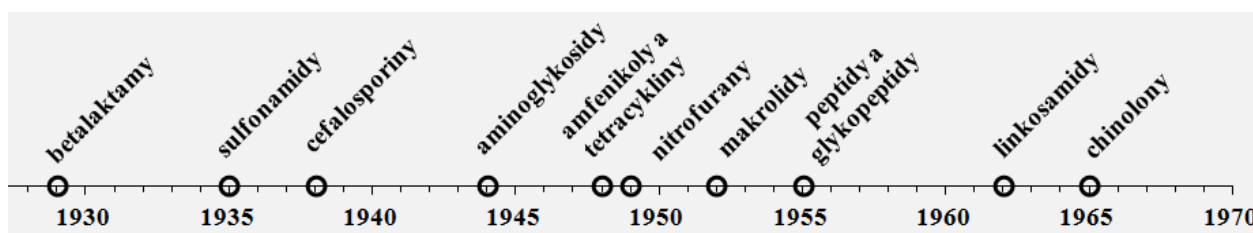
Je to jakákoliv látka nebo směs látek určená k použití při výrobě nebo přípravě léčivého přípravku, která se po použití při této výrobě nebo přípravě stane účinnou složkou léčivého přípravku, určenou k vyvinutí farmakologického, imunologického nebo metabolického účinku, a to za účelem obnovy, úpravy nebo ovlivnění fyziologických funkcí, nebo ke stanovení lékařské diagnózy [1]. Zpracovávají se do lékových forem jako tablety, čípky, injekce, masti, gely a další [2].

#### 2.1.2. Historie antibiotik

První dochované záznamy o použití rostlin, jejich výluhů a různých směsí živočišného původu k léčebným účelům, jsou datovány cca již od roku 2 000 př. n. l. Nicméně dříve ne všechny léčebné postupy stav pacienta zlepšovaly, bylo tomu hlavně z důvodu nevědomosti pravého původce infekce a způsobu jeho eliminace. Tato situace se změnila až v polovině 19. století (L. Pasteur, R. Koch). Významným přínosem byl rovněž objev mikroskopu (1670, A. Leeuwenhoek), který umožnil vidět věci lidskému oku doposud nemožné. V roce 1865, kdy byl do lékařské praxe jako antiseptický prostředek zaveden fenol, se úmrtnost pacientů prudce snížila. Přírodní fenoly byly používány již ve starověkém Egyptě jako balzamovací prostředky. Další významnou, často používanou látkou, byla kyselina salicylová, která se podávala zevně i vnitřně; nevýhodou byla ovšem její značná toxicita. Proto se další vývoj ubíral cestou k získání méně toxických substancí. Těmi byly například lysozym, který byl izolovaný z vaječného bílku, nebo penicilin. Předtím však byly učiněny další významné objevy, mezi které lze započít možnosti přenosu původců onemocnění, izolace bakteriálních druhů (streptokoky, stafylokoky, tuberkulóza, cholera, tyfus, záškrt a tetan) a rovněž poznatky o tom, že některé druhy bakterií mohou usmrctvat jiné druhy bakterií. V roce 1929 pak následoval objev penicilinu A. Flemingem; nicméně k jeho uvedení do praxe významně přispěl až H. Florey. Další vývoj směřoval k semisyntetickým penicilinům uvedeným na trh v 50. letech. Nastala jejich masová spotřeba, byly přidávány i do krmných směsí pro zvířata, což vyústilo i k rychlému vývoji rezistentních kmenů bakterií. Z hlediska spektra účinku jsou



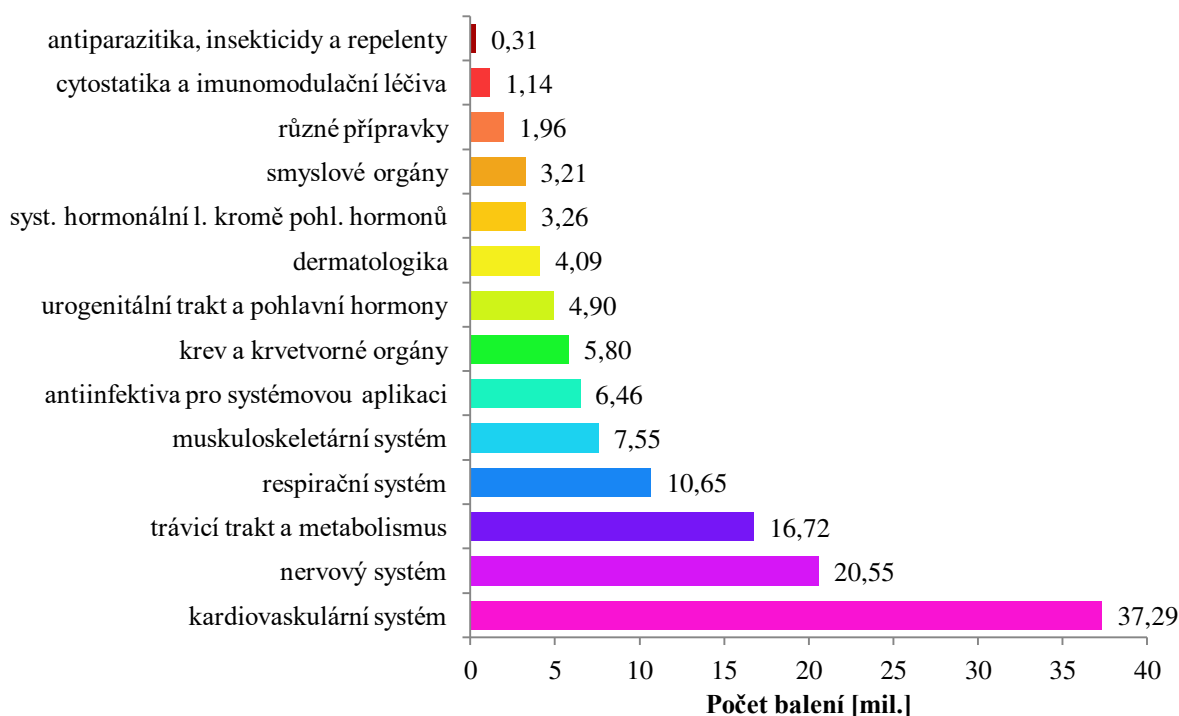
peniciliny aktivní pouze proti gramnegativním bakteriím. Malé procento populace je k těmto látkám sensitivní, a proto další výzkum a vývoj nových druhů antibiotik pokračoval a pokračuje i nadále [3; 4].



Obrázek č. 1: Časová osa vývoje antibiotik [4]

### 2.1.3. Antibiotika

Mají dominantní postavení ve skupině antiinfektiv. Pojmem antibiotika se označují látky přírodního nebo semisyntetického původu, které jsou produkovány mikroorganismy a zasahují do růstu jiných mikroorganismů [2; 4]. Naproti tomu antibakteriální chemoterapeutika jsou látky čistě syntetického původu, které také mají negativní účinky na růst určitých mikroorganismů. V užití těchto označujících termínů nejsou velké rozdíly, často jsou mezi sebou zaměňovány, případně je používán zavedenější pojem antibiotika pro obě dvě skupiny [4].



Graf č. 1: Počet balení vydaných léčivých přípravků v ČR za rok 2015 rozdělený do příslušných anatomicko-terapeuticko-chemických skupin [5]

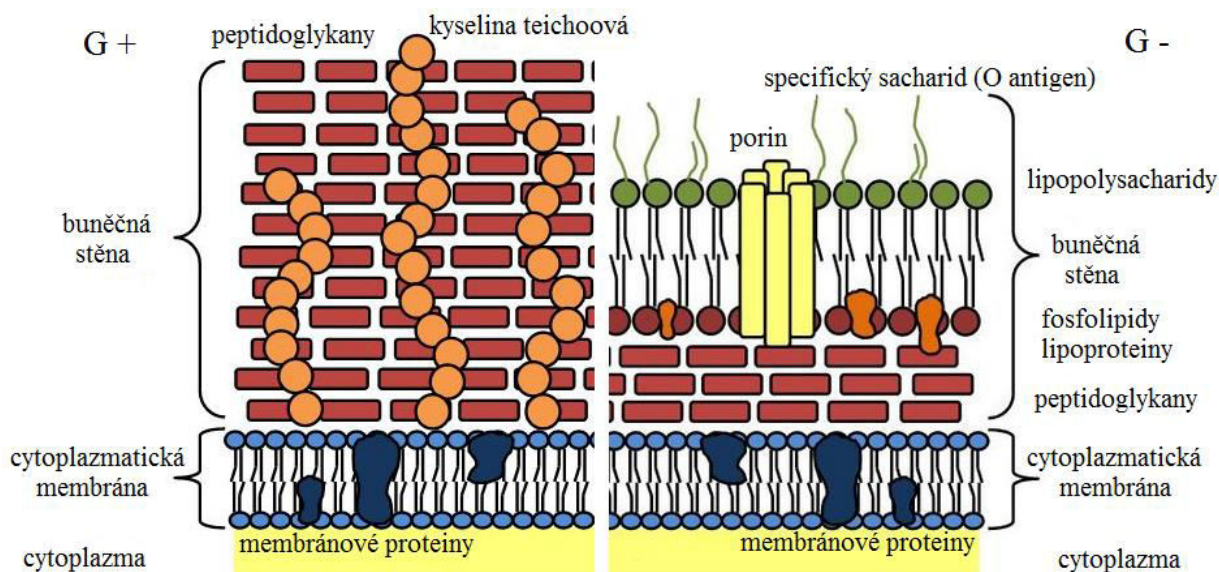
Na antiinfektiva pro systémovou aplikaci, ve které jsou antibiotika zařazena – tvoří její většinu (~ 93 %), připadalo v roce 2015 z celkového počtu vydaných balení léčivých přípravků 5,22 % [5]. Toto číslo je ve srovnání s množstvím vydaných léčiv pro léčbu kardiovaskulárního systému, nervového systému nebo trávicího traktu a metabolismu relativně malé. Nicméně pouze u této skupiny léčiv hrozí reálná možnost ztráty terapeutického účinku, která je způsobená adaptací mikroorganismů. Vývoj nových druhů antibiotik je procesem pomalým, nejnovější skupinou antibiotik jsou chinolony, jejich objev se datuje až k roku 1965, i tento fakt přidává problematice výskytu antibiotik v životním prostředí na důležitosti [4; 5].

#### 2.1.4. Rozdělení antibiotik

Způsobů pro rozdělení antibiotik do různých skupin je velké množství. Nejdůležitějšími však jsou:

- dělení podle spektra účinku,
- dělení podle způsobu účinku,
- dělení podle mechanismu účinku [4; 6].

Selektivní působení antibiotik je dáno rozdílnou stavbou buněk savčích (eukaryotických) a buněk bakteriálních (prokaryotických). Bakteriální buňky obsahují na rozdíl od savčích buněčnou stěnu, která je chrání při změnách osmotického tlaku [4; 7]. Bakterie se podle Gramova barvení rozdělují do dvou základních skupin, a to na *grampozitivní* (barví se tmavě fialově) a *gramnegativní* (barví se do červena); tyto rozdíly jsou způsobeny odlišnou chemickou stavbou buněčné stěny. Tyto rozdíly potom rovněž určují, zda konkrétní skupina antibiotik bude proti určitému typu bakterií účinná [7].



Obrázek č. 2: Rozdíly ve stavbě buněčné stěny grampozitivních (G +) a gramnegativních (G -) bakterií [8]

#### **2.1.4.1. Podle spektra účinku**

Dělí se do dvou skupin, na *širokospektrá* a *úzkospektrá* [4; 7].

Příkladem úzkospektrého antibiotika je penicilin G, který je aktivní pouze proti grampozitivním bakteriím. Jak již bylo výše prezentováno, tato skutečnost je způsobena rozdíly v chemické stavbě buněčné stěny. Grampozitivní bakterie disponují relativně tenkou buněčnou stěnou, která tak umožňuje průchod antibiotik do bakterie. Dalším důvodem jsou rozdíly v cílových receptorech, na které se antibiotika váží. Pokud daná bakterie tyto molekuly neobsahuje, účinek léčiva je tím pádem nulový [9].

Příkladem širokospektrých antibiotik je doxycyklin; spektrum zahrnuje grampozitivní i gramnegativní bakterie. Tato léčiva jsou indikována zejména v akutních případech, kdy původce onemocnění není doposud zjištěn a na jeho identifikaci není vzhledem ke kritickému stavu pacienta čas [10; 11].

#### **2.1.4.2. Podle způsobu účinku**

Dělí se na *primárně baktericidní* (např. peniciliny, cefalosporiny), které usmrcují patogenní zárodky a *primárně bakteriostatická* (např. makrolidy, sulfonamidy), která brání procesu rozmnožování bakterií. Nicméně bylo prokázáno, že i látky primárně baktericidní se mohou chovat v nižších koncentracích bakteriostaticky [4; 6].

#### **2.1.4.3. Podle mechanismu účinku**

##### ***Inhibice syntézy buněčné stěny***

Antibiotikum se váže na enzymy bakteriální buňky, které se podílejí na syntéze buněčné stěny. V důsledku toho se buňka přestává dělit a hyne [7; 11]. Do této skupiny antibiotik patří glykopeptidy, peniciliny a cefalosporiny [4; 6; 11].

##### ***Poškození buněčné cytoplazmatické membrány***

Zánik buněk nastává rovněž v důsledku ztráty selektivní permeability a buněčné integrity. Do této skupiny se zařazují nitroimidazoly a imidazoly [4; 6, 11].

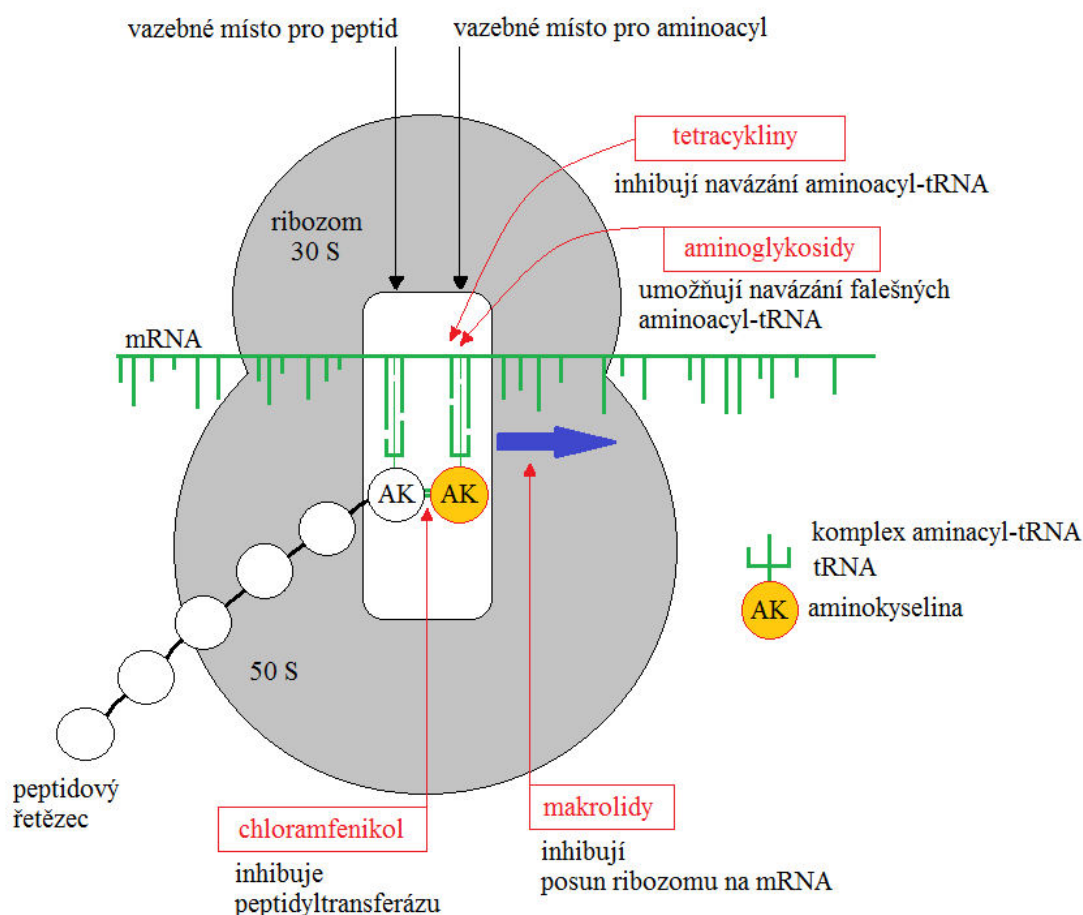
##### ***Inhibice metabolismu bakteriální buňky***

Bakterie pro svoji existenci vyžadují kyselinu paraaminobenzoovou (PABA), která je důležitým metabolitem pro syntézu kyseliny listové (důležitá při syntéze nukleových kyselin). Je tomu proto, že bakterie postrádají protein nutný k příjmu kyseliny listové z jejich okolí (na rozdíl od lidí – příjem pouze z potravy). Např. sulfonamidy jsou strukturálními analogy a kompetitivní antagonisté PABA a brání využití PABA k syntéze bakteriální kyseliny listové [7; 11].

##### ***Inhibice proteosyntézy***

Nové proteiny jsou nepřetržitě produkovány v procesu, který zahrnuje syntézu mRNA z DNA genů (transkripce) a následnou produkci proteinů z mRNA templátu (translace). Sestavování aminokyselin probíhá na ribozomu. Tyto procesy jsou nepostradatelné při růstu a zvyšování počtu bakterií; už jen drobná změna může vyústit ke ztrátě aktivity, např. zanesení špatné aminokyseliny do proteinu. Antibiotika se tak na tyto procesy mohou zaměřit a v důsledku

toho negativně ovlivňovat růst bakterie; zasahují na různých místech ribozomu [7; 11; 12; 13; 14]. Do této kategorie zařazujeme tetracykliny, aminoglykosidy, makrolidy, chloramfenikol a linkosamidy [4; 6; 11].



Obrázek č. 3: Mechanismy účinku antibiotik inhibujících proteosyntézu [13]

### 2.1.5. Problematika rezistence

Bakteriální rezistencí se rozumí schopnost populace mikroorganismů přežít účinek inhibiční koncentrace příslušného antibiotika. Stupeň a rozsah rezistence je dán chemickou strukturou preparátu, skladbou bakteriální buňky a její schopností zamezit účinku léčivé látky na receptorovém místě [4; 15]. Vznik této rezistence je stimulován zejména nadměrnou spotřebou antibiotik. Jedná se o očekávaný přirozený mechanismus, v rámci kterého se bakterie přizpůsobují ztíženým životním podmínkám. Může být přenášena mezi lidmi, mezi zvířaty, mezi lidmi a zvířaty a také prostředím. Vývoj nových léčiv je složitý, finančně a časově náročný proces; přibližně z 10 000 nově syntetizovaných látek se pouze jedna dostane do oběhu. Na druhou stranu životní cyklus bakterií je velice krátký; rozmnožují se cca každých 20 minut, což znamená, že rozvoj rezistence je relativně rychlý. Infekce způsobená rezistentními druhy bývá obtížně léčitelná, v některých případech až neléčitelná. Např. u pacientů s MRSA (methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*) se pravděpodobnost úmrtí zvyšuje o 64 % v porovnání s infekcí způsobenou nerezistentním druhem *Staphylococcus aureus*. Dalším znepokojujícím faktem je to, že v mnoha zemích EU lze antibiotika koupit bez lékařského předpisu [4; 12; 15; 16].

### 2.1.5.1. Druhy rezistence

**Přirozená (primární) rezistence** je způsobena tím, že bakterie nespádají do spektra účinku daného léčiva.

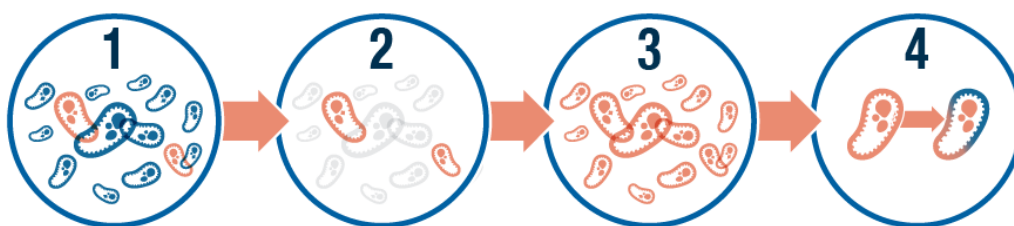
**Získaná (sekundární) rezistence** je mnohem závažnějším problémem, protože původně citlivá bakteriální populace se stává v průběhu léčby odolná vůči aplikované léčivé látce a je způsobena selekčními a mutačními procesy v bakteriální buňce [4; 15].

**Rezistence zkřížená** znamená odolnost bakterií na celou skupinu antibiotik s podobnou strukturou i odolnost vůči různým skupinám antibiotik se stejným mechanismem účinku [4; 6; 17].

### 2.1.5.2. Mechanismus vzniku rezistence

**Fenotypová změna** znamená adaptaci bakterií na změněné metabolické pochody. Jedná se o přechodnou změnu a lze ji potlačit vyšší dávkou antibiotika nebo jeho vysazením, čímž se postupně obnoví původní metabolické pochody [15].

**Genetická změna** je mnohem významnější – modifikace genu na chromozomu (ten je odpovědný za citlivost bakterie k antibiotiku) nebo převzetí genetického materiálu od rezistentních buněk [15]. Mezi tyto genetické změny patří změna v místě působení antibiotika, impermeabilita mikrobiální buňky, zvýšené vylučování antibiotika z bakteriální buňky a produkce inaktivačních enzymů [14].



Obrázek č. 4: Vývoj bakteriální rezistence: 1 - vysoké množství bakterií, z nichž je jen pár rezistentních; 2 - antibiotika zneškodňují bakterie způsobující onemocnění; 3 - rezistentní bakterie mají dobré podmínky pro růst; 4 - bakterie mohou přenášet svoji schopnost rezistence na další bakterie [18]

### 2.1.5.3. Zamezení rozvoje rezistence

- Užívání antibiotik jen pokud je to opravdu nutné,
- vybírání vhodného druhu antibiotika a jeho podávání pouze v nezbytně nutnou dobu,
- monitoring bakteriální rezistence v rámci nemocnic a společnosti,
- provádění doporučených změn v předepisování určitých antibiotik,
- zbavování se nepoužitých nebo prošlých léčiv adekvátní cestou [19].

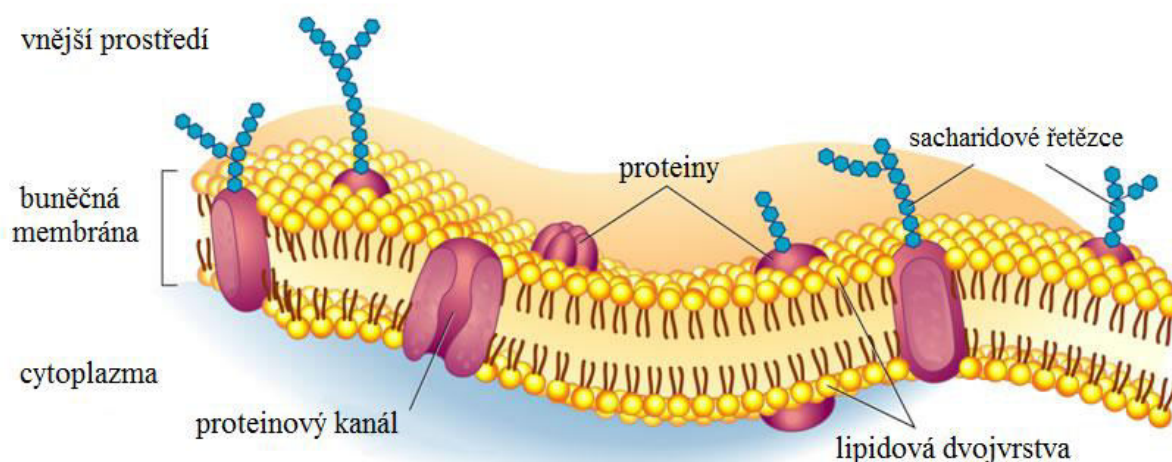


### 2.1.6. Farmakokinetika léčiv

Popisuje průběh účinku látky a pochody, ke kterým v organismu dochází po jejím podání, tj. časový průběh absorpce, biodostupnost, distribuce, metabolismus a exkrece. Popisuje nástup, délku trvání a intenzitu účinku dané látky. Hlavní způsoby aplikace léčiv jsou perorální, parenterální a zevní. Farmakokinetika léčiv závisí jednak na fyzické stránce pacienta (funkce ledvin, pohlaví, věk) a jednak také na chemických vlastnostech dané látky. Vzhledem k tomu, že rozdíly mezi jednotlivci nejsou zanedbatelné, je nutné přizpůsobit podávání medikamentů (velikost dávky, intervaly atd.) potřebám konkrétních pacientů. Znalosti farmakokinetiky tak umožňují předepisování ideálních dávek [4; 6; 13; 20].

#### 2.1.6.1. Absorpce

Je dána chemickými a fyzikálními vlastnostmi látky, lékovou formou a cestou podání. Bez ohledu na způsob podání musí být však léčivo přítomné v roztoku, aby mohlo být absorbováno (tablety musí být schopné rozpadu). Pokud není léčivo podáno intravenózně, musí nejdříve překonat několik buněčných membrán, než dosáhne systémové cirkulace. Buněčné membrány jsou přirozené bariéry, které selektivně inhibují průchod molekul látek. Jsou složeny primárně z biolipidů s charakteristickými permeabilními vlastnostmi. Léčiva mohou procházet membránami pasivní difúzí, usnadněnou pasivní difúzí, aktivním transportem nebo pinocytózou. Různé globulární proteiny, přítomné v membránách, slouží jako receptory a napomáhají transportu molekul přes membránu [13; 21].



Obrázek č. 5: Buněčná membrána [22]

#### *Pasivní difúze*

Tento děj nastává, když látky procházejí přes membránu z oblasti vysoké koncentrace do oblasti nízké koncentrace (např. z žaludku do krve); proces nevyžaduje spotřebu energie. Rychlost difúze je úměrná koncentračnímu gradientu, dále závisí na lipofilitě, velikosti molekuly, stupni ionizace podávané látky a velikosti aktivního absorpčního povrchu. Protože jsou membrány lipidické povahy, tak látky, které jsou rozpustné v tucích, prostupují těmito membránami nejrychleji. Stejná situace je u látek s nižší molekulovou hmotností. Lze konstatovat, že většina léčiv jsou slabé organické kyseliny nebo báze, které existují ve

vodném prostředí v neionizované nebo ionizované podobě. Neionizované formy jsou většinou dobře rozpustné v tucích a procházejí přes membrány snadno. Ionizované formy mají menší solubilitu v tucích, jsou hydrofilní, a proto je jejich přestup přes membrány znesnadněn. Poměr mezi disociovanou a nedisociovanou formou je dán okolním pH a disociační konstantou léčiva  $pK_a$ . Například při podání slabé organické kyseliny orálně, bude většina léčiva v žaludku přítomna v neiontové podobě; zlepši se tak přestup přes žaludeční sliznici. Větší část absorpce se nicméně uskutečňuje až v tenkém střevě, které disponuje větším povrchem a lepší permeabilitou membrán [13; 21].

### ***Usnadněná pasivní difúze***

Některé molekuly s menší lipofilitou (glukóza) přecházejí membrány ve větší míře, než by se na základě jejich chemických vlastností očekávalo. Molekula přenašeče v membráně se reverzibilně spojuje s molekulou substrátu (přenášené látky) na vnější straně membrány a vytvořený komplex prochází membránou rychleji; na druhé straně membrány pak přenašeč molekulu substrátu uvolňuje. Usnadněnou pasivní difúzí jsou přenášeny pouze látky o relativně specifické molekulové konfiguraci. Proces nevyžaduje spotřebu energie ale transport proti koncentračnímu gradientu však možný není [21].

### ***Aktivní transport***

Je selektivní, vyžaduje spotřebu energie a zahrnuje i transport proti koncentračnímu gradientu. Tento přenos je limitován pouze na léčiva strukturně podobná endogenním látkám, jakými jsou ionty, vitamíny, cukry a aminokyseliny. Léčiva jsou většinou absorbována na specifických místech v tenkém střevě [21].

### ***Pinocytóza***

Tekutiny nebo molekuly látek mohou být pohlcovány buňkami. Jedná se o vchlípení, oddělení části buněčné membrány a vytvoření malých vezikul obsahujících extracelulární komponenty uvnitř buňky. Obsah váčků je v buňce následně uvolněn. Tento proces vyžaduje příjem energie. Hraje menší roli v transportu léčiv, uplatňuje se např. při přestupu inzulinu přes hematoencefalickou membránu [11; 21].

#### ***2.1.6.2. Biodostupnost***

Popisuje rozsah a rychlost vstupu účinné látky do systémového oběhu a tím i její přístup k receptorům. Biodostupnost látky je do značné míry dána vlastnostmi lékové formy. Věk, pohlaví, fyzická aktivita, kondice, stres aj. hrají rovněž důležitou roli. Chemické reakce, jako formace komplexů a hydrolýza, mohou biodostupnost snižovat. Orálně podaná léčiva musí projít stěnou střev až do jater a teprve potom se dostanou do systémové cirkulace. Ještě před vstupem do oběhu tak mohou tyto látky podléhat metabolizaci. Nízké hodnoty biodostupnosti se vyskytují většinou u léčiv podaných orálně, špatně rozpustných ve vodě a pomalu se absorbujících [23].

### **2.1.6.3. Distribuce**

Potom, co se léčivo dostane do systémové cirkulace, je distribuováno do tkání těla. Distribuce není na všech místech stejná, a to vzhledem k rozdílům v prokrvení, v úrovni vazby na tkáň, v okolním pH a v permeabilitě buněčných membrán. Maximální tkáňové koncentrace je dosahováno rychleji v oblastech s větším prokrvením. Metabolismus a exkrece léčiva se vyskytují současně s jeho distribucí, což dělá celý proces dynamickým a komplexním. Některá léčiva jsou distribuována především do tuku, některá zůstávají v extracelulárních tekutinách a některá jsou vázána ve velké míře na specifické tkáně. Rozsah distribuce léčiv do tkání závisí na stupni vázání na proteiny plazmy nebo na stupni vázání na tkáň. V krevním řečišti jsou léčiva přenášena částečně ve volné podobě a částečně reversibilně vázána na složky krve (plasma proteiny, krvinky). Je však známo, že pouze volné léčivo je schopno pasivní difúze do tkání, kde je dosahováno farmakologického efektu; proto jeho koncentrace v oběhu udává i koncentraci na aktivních místech. Léčiva se však dále váží na mnohé jiné látky, a proto vysoce lipofilní léčiva mohou vykazovat dlouhý čas v ustálení rovnováhy v tukových tkáních (i vzhledem k nízkému prokrvení) [13; 24].

### **2.1.6.4. Metabolismus**

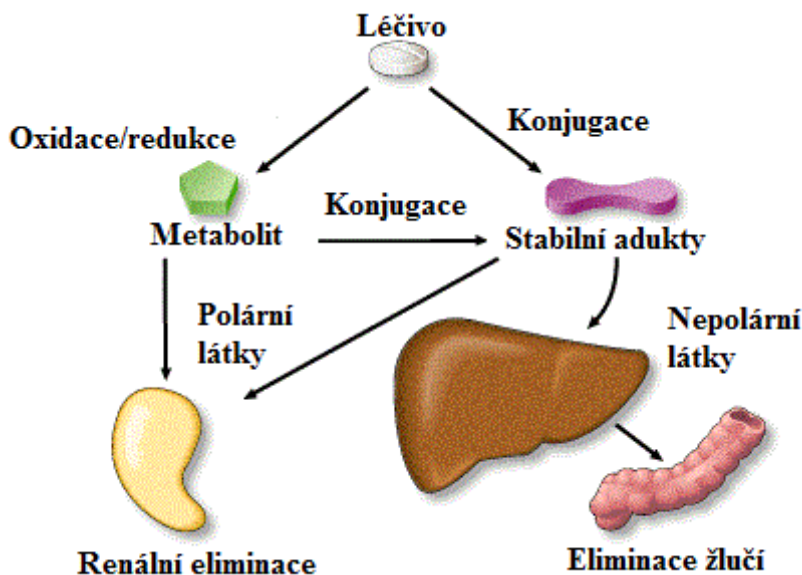
Hlavním místem metabolizace jsou játra. Metabolizace sice typicky převádí léčiva do neaktivních forem, avšak u některých látek tomu tak není. Jejich metabolity proto zůstávají aktivní, případně se jejich aktivita ještě zvyšuje. Léky mohou být metabolizovány oxidací, redukcí, hydrolýzou, hydratací, konjugací, kondenzací nebo izomerizací. Cílem metabolizace je převést léčivo na formu, kterou lze snáze vylučovat. Enzymy zapojené do metabolizace jsou sice přítomné v mnoha tkáních, avšak jejich koncentrace v játrech je nejvyšší. Rychlost metabolizace se liší u jednotlivých pacientů. U mnoha léčiv probíhá jejich metabolizace ve dvou fázích. Ve fázi I dochází k reakcím vedoucím k novým nebo modifikovaným funkčním skupinám, případně k rozpadu vazeb. Fáze II spočívá v konjugaci s endogenními látkami (např. kyselina glukuronová, glycin). Metabolity formované konjugací jsou více polární, a proto jsou rychleji vyměšovány ledvinami (moč) a játry (žluč). Některá léčiva podléhají pouze jedné z fází metabolizace, tj. některá pouze fázi I, jiná zase pouze fázi II. Nejdůležitějším enzymem fáze I je cytochrom P-450, který katalyzuje oxidaci mnoha léčiv. Glukuronidace představuje nejčastější reakci probíhající ve fázi II [25].

### **2.1.6.5. Eliminace léčiv z organismu**

Ledviny jsou hlavním orgánem umožňujícím exkreci ve vodě rozpustných látek. Vylučování látek pomocí slin, potu, mateřského mléka, plic a střev je zastoupeno minoritně. Metabolizací v játrech vznikají metabolity s vyšší polaritou a s větší rozpustností ve vodě. Pro většinu látek se uplatňuje renální filtrace. Přibližně 1/5 objemu plazmy dosahuje ke glomerulu a je filtrována přes póry v glomerulárním endotelu. Téměř veškerá voda a většina elektrolytů je pasivně nebo aktivně vstřebávána z renálních tubulek zpět do oběhu. Polární sloučeniny, jako jsou metabolity léčiv, nemohou difundovat zpět do oběhu a jsou proto eliminovány. Léčiva vázána na proteiny plazmy zůstávají v oběhu. Některé látky a jejich metabolity jsou naopak



více vylučovány žlučí. Látky s molekulovou hmotností větší než 300 g/mol, s polárními i lipofilními skupinami jsou více eliminovány žlučí. Menší molekuly jsou tímto způsobem eliminovány pouze v zanedbatelném množství. Konjugace s kyselinou glukuronovou se spolupodílí v exkreci žlučí [26].



Obrázek č. 6: Eliminace léčiv z organismu [27]

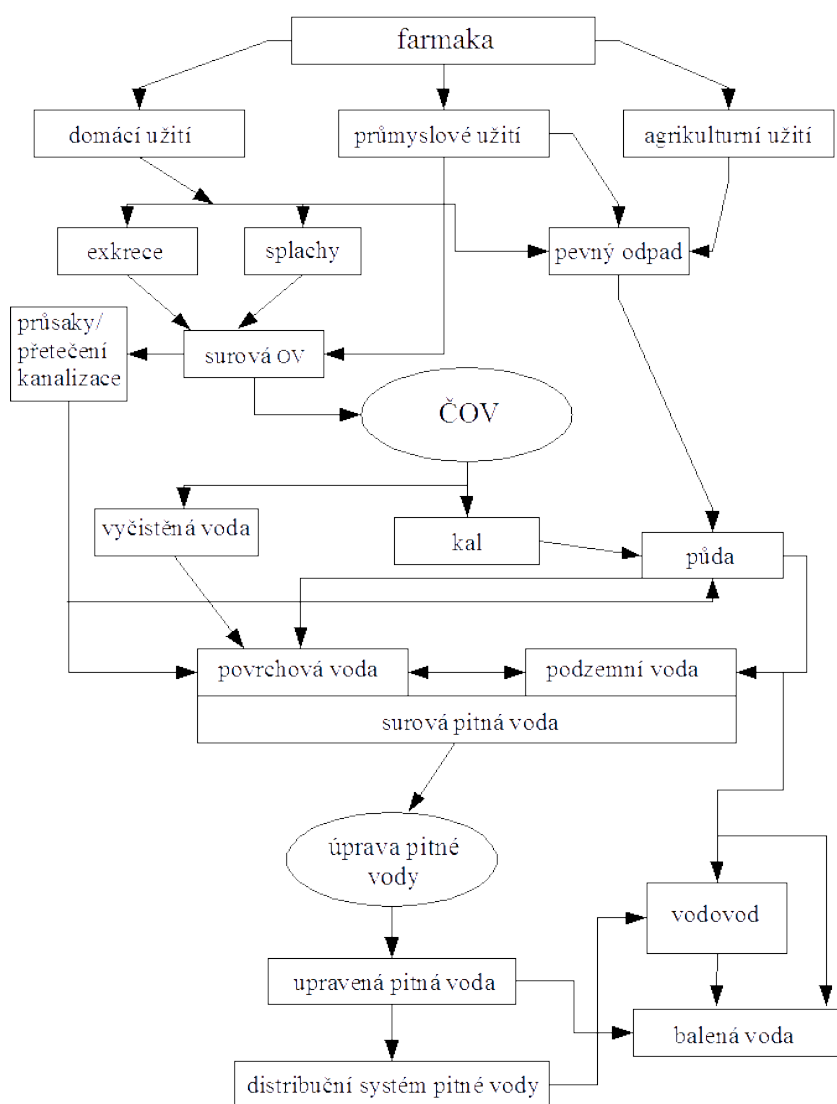
### 2.1.7. Farmakodynamika

Popisuje a studuje biochemické a fyziologické účinky léčivých látek, včetně mechanismů působení, a to s cílem určit jejich terapeutické účinky a toxické důsledky jejich podávání. Látka se po vstupu do organismu dostává na cílové místo svého působení a po navázání na receptor vyvolá určitý specifický efekt. V případě antibiotik je receptorem určitá strukturální komponenta buněčného organismu, která interaguje s látkou [11; 20]. Mechanismy účinku antibiotik byly popsány v kapitole 2.1.4.3.

### 2.1.8. Cyklus antibiotik v životním prostředí a jejich osud na čistírnách odpadních vod

Léčiva jsou po aplikaci ve velké míře vylučována v nezměněné podobě nebo v podobě metabolitů prostřednictvím moči nebo výkalů. Léčiva se takto dostávají přímo do surové odpadní vody. Kromě toho dochází buď k přímým splachům prošlých léčiv do odpadní vody, případně spláchnutím pacienty nechtěných léčiv do toalety. Léčiva mohou putovat rovnou i do komunálního odpadu. Zdrojem kontaminace jsou rovněž odpadní vody z farmaceutických firem, nemocničních a ostatních zdravotnických zařízení. Surová odpadní voda následně vstupuje na čistírnu odpadních vod (ČOV), jejíž technologie by měla přispět k odstranění patogenů, pachu, barvy, kalnosti, BSK<sub>5</sub> a nutrientů (dusík, fosfor), a to pomocí kombinace mechanického, chemického a biologického čištění. Výstupem tohoto čistícího procesu jsou dvě frakce, a to kapalná v podobě odtoku vyčištěné vody a pevná v podobě kalu. Vyčištěné odpadní vody slouží k zavlažování v zemědělství nebo putují zpět do vod povrchových a uzavírají tak vodní cyklus. Léčiva přítomná v povrchové nebo závlahové vodě mají potom možnost sekundárně kontaminovat vody podzemní, studny a prameny. Do povrchových a podzemních vod se tyto látky dostávají rovněž vymýváním z farmaceutického

a komunálního odpadu, ve kterých jsou přítomny. Čistírenské kaly použité v zemědělství se mohou také stát zdrojem kontaminace. Další možnou cestou vstupu farmak do povrchových a podzemních vod jsou průsaky kanalizační sítě nebo její přetečení (silné deště, tání sněhu, havárie). Na rozdíl od vod povrchových, které procházejí mnohastupňovým čištěním pro odstranění chemických a biologických kontaminantů, voda podzemní bývá v mnoha případech přímo používána jako voda pitná, a to bez významnějších úprav. I z tohoto důvodu sledování kontaminace vod léčiv nabývá na důležitosti [28; 29].



Obrázek č. 7: Cyklus antibiotik v životním prostředí [28]

#### 2.1.8.1. Problematika kalů

Nechtěným bioproduktem čištění odpadních vod je kal, který je ještě v ČOV zpracováván na kal stabilizovaný, který je již možno použít k zemědělským účelům. Tato možnost je ovšem omezována legislativně (v ČR Zákon č.185/2001 Sb. o odpadech a o změně některých dalších zákonů), zejména vzhledem k možnému obsahu těžkých kovů a dalších kontaminujících látek. V průběhu čištění odpadních vod umožňuje vysoké procento organického uhlíku přítomného v kalu sorpci a obohacení o hydrofobní organické látky. Akumulace určitých farmak sorpcí na

kal může napomáhat k jejich odstraňování z vodního prostředí, avšak současně představuje problémy při pozdějším nakládání s těmito produkty. Léčiva přítomná v kalech aplikovaných na pole představují riziko pro člověka i pro životní prostředí. Na základě jejich chemicko-fyzikálních vlastností mohou být tyto látky silně sorbovány na půdu, přetrvávat zde dlouhou dobu a působit toxicky na půdní bakterie a další mikroorganismy; takto mohou nepříznivě ovlivňovat kvalitu půdy. Léčiva mohou také přestupovat do rostlin a plodin, které jsou součástí potravy člověka i zvířat [28; 30].

### **2.1.9. Technologie čištění odpadních vod**

Obecně je tento proces složen z *čištění primárního*, které zahrnuje fyzikální a chemické procesy. Jako první jsou zařazeny česle a síta sloužící k odstranění hrubých nečistot do velikosti cca 1 mm. Následuje lapák písku, lapák tuků a plovoucích nečistot, flotace a primární usazování. Do kategorie *sekundárního čištění* spadají procesy biologické, které konverzí organické znečištění na usaditelnou biomasu. Pro tyto účely jsou na ČOV používány různé aktivační systémy, biofilmové reaktory a stabilizační nádrže. O výsledném složení technologických zařízení ČOV rozhoduje zejména charakter znečištění přitékající vody; je známo, že jiný způsob čištění bude vyžadovat voda s vysokým obsahem BSK<sub>5</sub> (mlékárny, jatka) nebo s vysokým obsahem kovů (galvanovny) [31; 32].

Studie, ve kterých se provádělo porovnávání účinnosti odstranění farmak z různých technologicky vybavených ČOV, prokázaly, že konvenční způsob čištění zahrnující aktivovaný kal dosahoval pro některá analgetika účinnosti nad 90 %, pro antibiotika tomu však bylo pod 50 %. Na druhou stranu kořenové čistírny vykazovaly vesměs účinnost nad 84 %, a to pro všechny skupiny zkoumaných léčiv; jejich efektivita však byla snížena v zimních měsících; pro makrolidy byl zaznamenán nejvyšší pokles [33].

#### **2.1.9.1. Pokročilé oxidační procesy**

K odstraňování biologicky aktivních látek z odpadních vod se začaly jako vhodný způsob pro jejich eliminaci používat pokročilé oxidační procesy. Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem, které souvisejí s kontaminací odpadních vod léčivy, je nezbytné aplikovat a dále vyvíjet vhodné pokročilé procesy, které by poskytovaly účinné odstranění nežádoucích polutantů. Na úpravných pitných vod patří již tyto procesy k zavedenějším postupům, než je tomu u vod odpadních. Důvody jsou především finanční, protože surová voda používaná k úpravě na vodu pitnou nepředstavuje tak komplexní a složitou matici, jak je tomu u vody odpadní. V obou případech tyto procesy vyžadují další podrobný výzkum, který by objasnil, zda dochází ke kompletnímu odstranění léčiv, případně zda dochází pouze k jejich transformaci na další produkty, které mohou nebo nemusí být toxické [28; 29].

### **Úpravny pitných vod**

Také surová voda používaná k přípravě vody pitné může být kontaminována léčivy. Tyto koncentrace se převážně pohybují v řádech jednotek až desítek ng/l. Účinnost odstranění v průběhu úpravy vody je dána chemickou podstatou kontaminantů a aplikovanými technologiemi. Pouze jedna technologie není schopna zajistit odstranění širokého spektra kontaminantů. Vedle používaných oxidačních procesů, jakými jsou ozonace a chlorace, se dále používá písková filtrace, koagulace s následnou sedimentací, filtrace přes aktivní uhlí

a membránové procesy. Použití Fe-TAML katalyzátorů se ukazuje být účinné například při odstraňování estrogenních látek. U makrolidových antibiotik bylo prokázáno, že pro jejich odstranění je vhodná také ozonace. Pro klarithromycin byl zjištěn účinný kontakt po dobu 5 minut s koncentrací ozonu 0,5-1 mg/l. Roxithromycin vyžadoval delší dobu kontaktu, tj. 30 minut s koncentrací 0,5-1 mg/l [34; 35].

### **Čistírny odpadních vod**

Protože ČOV nejsou v současnosti koncipovány na odstraňování mikropolutantů z odpadních vod, stávají se proto jejich významným bodovým zdrojem. K dosažení účinnějšího odstranění těchto látek musí být čistící procesy optimalizovány. Kromě toho je také důležité porozumět osudu jednotlivých detekovaných léčiv na každé ČOV individuálně. Vzhledem k tomu, že konvenční biologický stupeň čištění tyto látky není schopen zcela odbourat, jsou navrhovány různé alternativy, a to zejména pokročilé oxidační procesy zahrnující dezinfekci vody ozonem, chlorem nebo UV zářením [36; 37].

#### ***Ozonace***

Limitujícími faktory použití ozonace jsou vysoká cena zařízení a spotřeba energie. Na velkokapacitních ČOV se tento proces dosud mnoho neuplatňuje [36]. Optimalizovaný proces může vykazovat až 90% účinnost odstranění pro některá antibiotika. Účinná dávka 3 mg/l byla zjištěna jako optimální pro makrolidy, protože všechna léčiva z této skupiny mají terciární dimethylamino- skupinu, na kterou ozon působí [37; 38].

#### ***Chlorace***

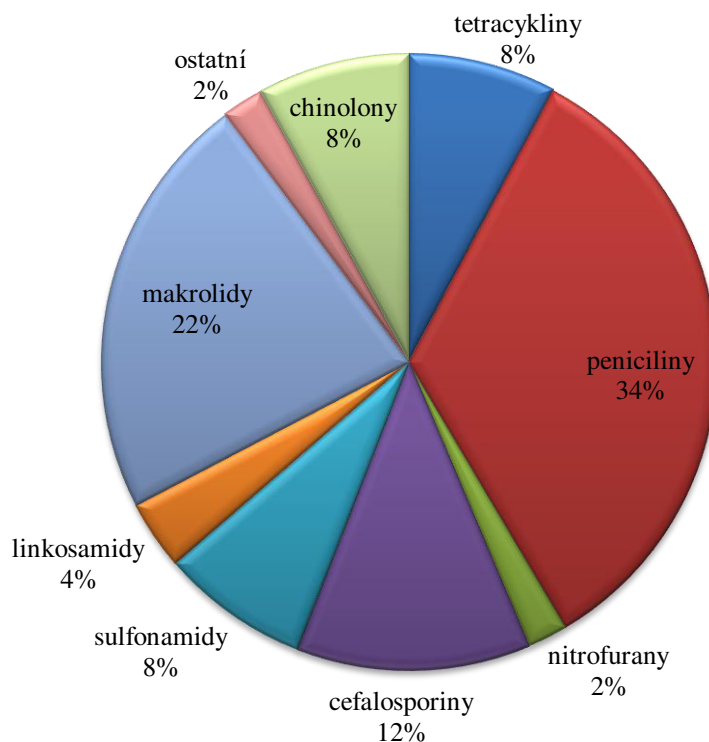
Je sice účinná, avšak znepokojujícím faktorem je přítomnost velkého množství chlorovaných produktů. Na některých ČOV je chlorace používána, a to především z důvodu své nízké ceny (chlorační činidlo je buď v podobě volného chloru nebo v podobě  $\text{ClO}_2$ ). Při aplikaci chlorace je důležité držení optimalizovaného pH, protože i malá změna pH může pro některá antibiotika znamenat výrazný pokles v účinnosti. Na účinnost odstranění má rovněž vliv obsah amoniaku, protože jeho vyšší koncentrace ovlivňují proces negativně (kompetice amoniaku s polutanty o chlorační činidlo) [36].

#### ***UV záření***

Jeho aplikace je méně efektivní, jelikož vyžaduje mnohonásobně větší dávky, aby byla na odtoku zajištěna 90% účinnost, a to v porovnání s chlorem [36].

## 2.2. Makrolidová antibiotika

Makrolidy tvoří velmi důležitou skupinu antibakteriálních sloučenin, protože se používají jak v humánní, tak i ve veterinární praxi. Ve veterinární praxi mohou být aplikovány i jako promotory růstu [39; 40]. V ČR tvoří jejich spotřeba, a to z celkového počtu antibiotik, 22 %. Po penicilínech jsou druhou nejfrekventovaněji užívanou skupinou antibiotik [41].



Graf č. 2: Procentuální zastoupení jednotlivých skupin antibiotik z jejich celkové spotřeby za rok 2015 [41]

Spektrum účinku lze považovat za průměrné, primárně působí bakteriostaticky. Nejčastěji jsou podávána perorálně, a to vzhledem k jejich dobrému vstřebávání z GIT traktu; dalším často využívaným způsobem je aplikace parenterální. Po orálním podání jsou léčiva dobře absorbována a rozsáhle distribuována do tkání, zejména do plic, jater a ledvin. Jejich toxicita je relativně nízká, pouze při vyšších dávkách vykazují určitý stupeň hepatotoxicity [6].

Jsou vysoce účinné proti grampozitivním bakteriím, jako jsou streptokoky, pneumokoky a stafylokoky. Rovněž se uplatňují proti gramnegativním bakteriím jako *Mycoplasmas*, *Chlamydia*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori* a *Rickettsia*, brání také růstu *Legionella pneumophila*. Bývají velice účinné v léčbách specifických onemocnění, jako jsou například respirační infekce [14; 39; 40; 42; 43; 44]. Jejich mechanismus účinku spočívá v potlačení syntézy proteinů. Vážou se na 50S podjednotku bakteriálního ribozomu v místě, ve kterém blokují výstup nově syntetizovaných proteinů. U osob alergických na peniciliny představují makrolidy vhodnou alternativu [14; 39; 44; 45].

Makrolidová antibiotika obsahují ve své struktuře makrocyclický laktonový kruh, který je pomocí glykosidické vazby spojen s cukernou jednotkou. Právě přítomnost cukerných jednotek způsobuje antimikrobní aktivitu. V závislosti na počtu atomů obsažených v makrocyklu mohou být zařazena do tří hlavních skupin, jak shrnuje následující tabulka č. 1. Existuje celá další řada makrolidů s jinou velikostí cyklu, ta ale nejsou v současnosti používána, jelikož jsou teprve ve fázi výzkumu [39; 46]. Některá z těchto léčiv jsou přirozeného původu (erythromycin, spiramycin) a některá jsou semisyntetická (roxithromycin, klarithromycin). Vybraná léčiva ze skupiny semisyntetických můžeme zařadit do speciálních podskupin (azithromycin – azalidy, telithromycin – ketolidy) [6].

Tabulka č. 1: Rozdělení makrolidů podle počtu atomů v cyklu [39]

<b>14 atomů v cyklu</b>	erythromycin, oleandomycin, roxithromycin, dirithromycin, klarithromycin, fluorithromycin, telithromycin
<b>15 atomů v cyklu</b>	azithromycin
<b>16 atomů v cyklu</b>	josamycin; rosaramycin; rokitamycin; kitasamycin; mirosamycin; spiramycin; tylosin

Většina z výše prezentovaných makrolidů je produkována organismy *Streptomyces* [39; 43].

Z hlediska farmakokinetiky opouští více než 60 % léčiva organismus v nezměněné podobě. Běžné technologické postupy čištění odpadních vod, které jsou aplikované na ČOV, nejsou schopny plně eliminovat tato rezidua. Orientačně se koncentrace makrolidů na odtocích z ČOV pohybují v desítkách až stovkách ng/l (v závislosti na spotřebě daného léčiva ve spádové oblasti ČOV) [43; 44].

Bakteriální rezistence má zvyšující se trend a může být realizována více mechanismy:

- inhibice vstupu léčiva a jeho akumulace – makrolidy mají potíž penetrovat vnější membránu velkého množství aerobních gramnegativních bakterií a proto jsou aktivně vypuzovány z některých rezistentních bakterií;
- enzymem zprostředkovaná změna ve vázání ribozomu – methylace části 50S ribozomu, na kterou by se za normálních podmínek léčivo vázalo;
- mutace vazebného místa ribozomu.

Vzhledem k výše popsaným mechanismům vzniku rezistence lze předpokládat, že rezistence na jedno konkrétní makrolidové antibiotikum bude znamenat rezistenci i pro ostatní členy této skupiny [14].

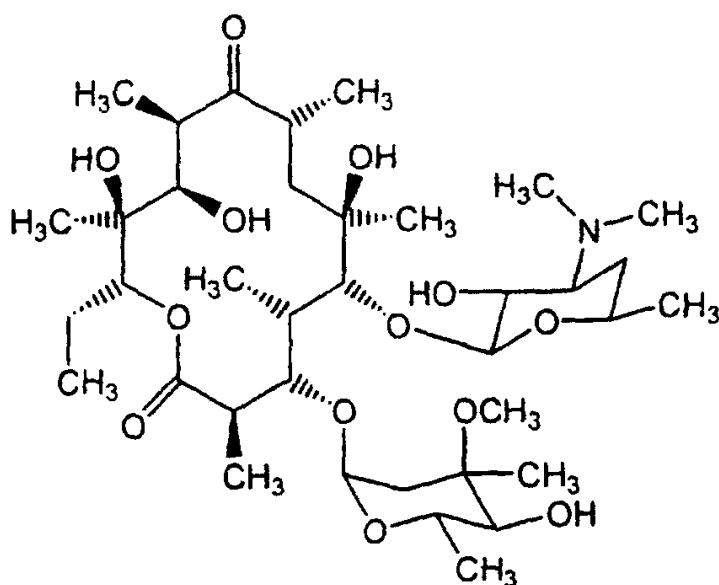
## 2.2.1. Charakteristika vybraných makrolidů

### 2.2.1.1. Erythromycin

Je produkován druhem bakterií *Streptomyces erythreus*. Během fermentace jsou produkovány tři druhy erythromycinu, a to A, B a C; hlavním a nejdůležitějším druhem je typ A [47]. Má široké spektrum účinku, může působit bakteriostaticky nebo baktericidně, a to v závislosti na jeho koncentraci v místě infekce a citlivosti organismu [48]. Dobře proniká do tkání s výjimkou mozkomíšního moku a synoviální tekutiny. Vylučuje se převážně stolicí [6].

Tabulka č. 2: Základní vlastnosti erythromycinu [47; 49; 50; 51; 52]

<b>sumární vzorec</b>	$C_{37}H_{67}NO_{13}$
<b>relativní molekulová hmotnost</b>	733,9 733,5 monoizotopická
<b>pK<sub>a</sub></b>	8,90
<b>logK<sub>ow</sub></b>	3,06
<b>BCF</b>	49
<b>rozpustnost (25 °C)</b>	voda ~ 2 mg/l plně rozpustný v alkoholech, acetonu, acetonitrilu
<b>UV λ<sub>max</sub></b>	280 nm (pH=6,3)
<b>popis</b>	bílé nebo lehce nažloutlé krystalky nebo prášek slabě hygroskopický pH < 4 působí destruktivně
<b>léčiva</b>	Aknemycin, Isotrexin, Zineryt



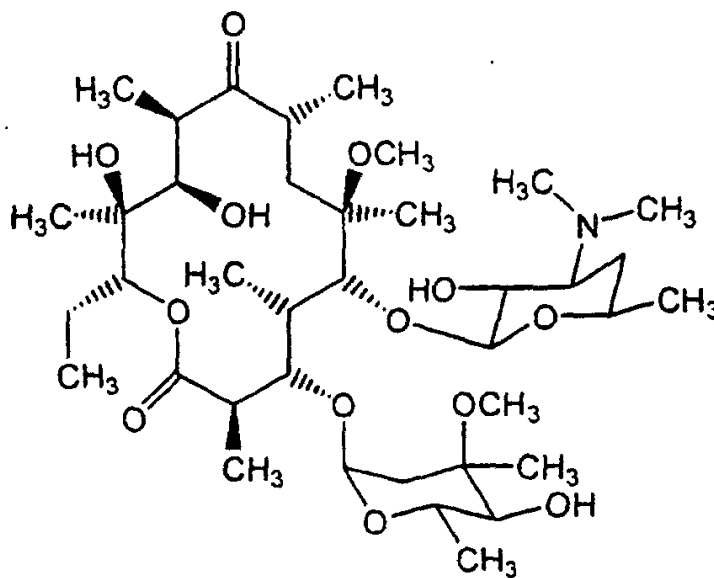
Obrázek č. 8: Chemická struktura erythromycinu [53]

#### 2.2.1.2. Klarithromycin

Klarithromycin byl vyvinut z erytromycinu z důvodu dosažení větší stability v kyselém prostředí; má rovněž dobré farmakokinetické vlastnosti, je účinnější a také je mnohem lépe snášen [6; 43; 46]. Vylučuje se převážně žlučí do stolice. Asi 20 % z celkového množství metabolitů tvoří 14-hydroxy(R)-klarithromycin, který zůstává antimikrobně aktivní [6; 46; 54].

*Tabulka č. 3: Základní vlastnosti klarithromycinu [47; 49; 52; 55; 56]*

<b>sumární vzorec</b>	C <sub>38</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>13</sub>
<b>relativní molekulová hmotnost</b>	748,0 747,5 monoizotopická
<b>pK<sub>a</sub></b>	8,99
<b>logK<sub>ow</sub></b>	3,16
<b>BCF</b>	56
<b>rozpustnost (25 °C)</b>	voda ~ 1,7 mg/l rozpustný v alkoholech, acetonitrilu
<b>UV λ<sub>max</sub></b>	211 nm, 288 nm (v methanolu)
<b>popis</b>	bílý nebo téměř bílý krystalický prášek stabilní v kyselém prostředí
<b>léčiva</b>	Clarithromycin, Fromilid, Klacid



Obrázek č. 9: Chemická struktura klarithromycinu [53]

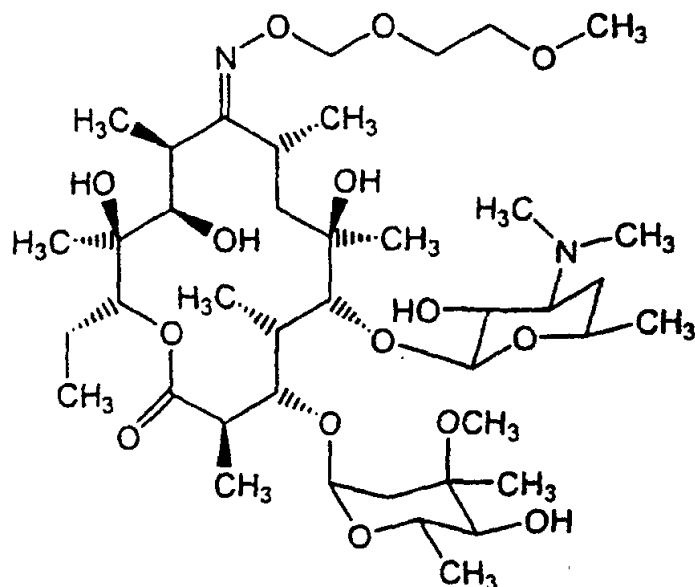


### 2.2.1.3. Roxithromycin

Semisyntetické antibiotikum, které bylo získáno z erytromycinu; má 14-ti členný laktonový kruh [39]. Velmi dobře a rychle se vstřebává z trávicího traktu a také velmi dobře proniká do tkání; vylučuje se převážně stolicí [6]. Má stejné spektrum účinku jako erythromycin, avšak je více efektivní proti některým gramnegativním bakteriím, obzvláště pak proti *Legionella pneumophila* [57].

Tabulka č. 4: Základní vlastnosti roxithromycinu [47; 49; 52; 57; 58]

<b>sumární vzorec</b>	C <sub>41</sub> H <sub>76</sub> N <sub>2</sub> O <sub>15</sub>
<b>relativní molekulová hmotnost</b>	837,1 836,5 monoizotopická
<b>pK<sub>a</sub></b>	9,08
<b>logK<sub>ow</sub></b>	3
<b>BCF</b>	67
<b>rozpustnost (25 °C)</b>	voda ~ 0,02 mg/l snadno rozpustný v acetonu, ethanolu, dichlormethanu
<b>UV λ<sub>max</sub></b>	210 nm
<b>popis</b>	bezbarvé krystalky stabilní v kyselém prostředí
<b>léčiva</b>	Roxithromycin



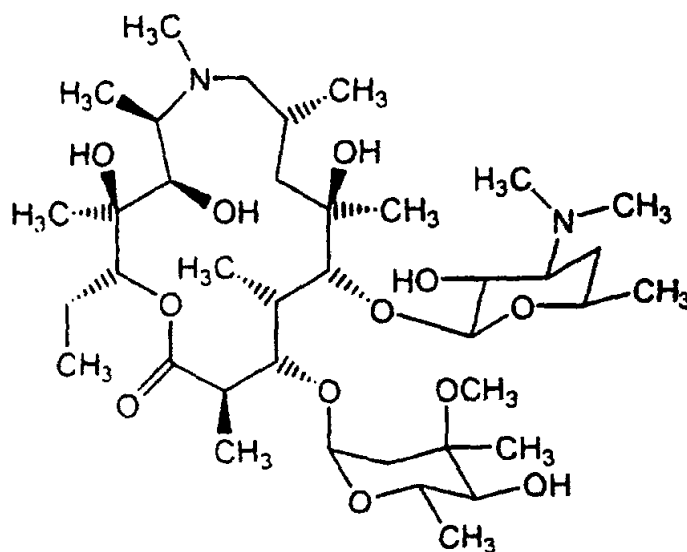
Obrázek č. 10: Chemická struktura roxithromycinu [53]

#### 2.2.1.4. Azithromycin

Nové, semisyntetické makrolidové antibiotikum, které obsahuje 15-ti členný laktonový kruh, do kterého je začleněn dusík [6]. Výrazně širší antibakteriální spektrum v porovnání s erytromycinem; má větší stabilitu v kyselém prostředí a také lepší farmakokinetické vlastnosti. Dosahuje nízkých sérových koncentrací, avšak vysokých tkáňových koncentrací. V organismu přetrvává ještě řadu dní po ukončení podávání [6; 11; 39].

Tabulka č. 5: Základní vlastnosti azithromycinu [47; 52; 59; 60]

<b>sumární vzorec</b>	C <sub>38</sub> H <sub>72</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub>
<b>relativní molekulová hmotnost</b>	749,0 748,5 monoizotopická
<b>pK<sub>a</sub></b>	8,74
<b>logK<sub>ow</sub></b>	4,02
<b>BCF</b>	200
<b>rozpustnost (25 °C)</b>	voda ~ 2,37 mg/l ethanol
<b>UV λ<sub>max</sub></b>	210 nm
<b>popis</b>	bílý krystalický prášek
<b>léčiva</b>	Azibiot, Azitrox, Azyter, Azithromycin



Obrázek č. 11: Chemická struktura azithromycinu [53]

#### 2.2.1.5. Osud makrolidů v životním prostředí

Průnik do životního prostředí (ŽP), a to zejména prostřednictvím odpadních vod. Vzhledem k malé účinnosti odstraňování těchto látek na ČOV se právě ČOV stává hlavním bodovým zdrojem kontaminace. Hodnoty konstant pK<sub>a</sub> nasvědčují tomu, že daná léčiva se budou v environmentálním prostředí vyskytovat téměř výhradně v kationické podobě. Tyto kationty jsou více sorbovány na půdu s vyšším obsahem organického uhlíku a jílu. Ve vodě se dá na základě jejich hodnot logK<sub>ow</sub> předpokládat i sorpce na pevné částice a sediment, také mobilita

v půdě bude díky těmto hodnotám rovněž malá. Biokoncentrační faktor (BCF) udává poměr koncentrace látky v organismu a koncentrace látky ve vodě, jeho hodnoty se pohybují v řádech jednotek až milionů. Hodnoty v rozpětí 1-100 klasifikují látky jako potenciálně bioakumulovatelné a hodnoty nad 100 je klasifikují jako rizikové z hlediska bioakumulace [61]. Azithromycin tedy patří k potenciálně rizikovým látkám. Hydrolýza je považována za jednu z nejdůležitějších cest eliminace ze ŽP [50; 55; 58; 59].

### **2.3. Metody stanovení makrolidů ve vodách**

K analýze těchto léčiv je nejčastěji používána kapalinová chromatografie. Detekce může být provedena spektrofotometricky, např. za použití DAD. Avšak vzhledem k tomu, že makrolidy vzhledem ke své chemické struktuře vykazují slabší odezvu na spektrofotometrických detektorech, je výhodnější pro jejich stanovení zvolit hmotnostně spektrometrickou detekci. Použití MS přináší znatelné zvýšení citlivosti. V menší míře lze pro některé makrolidy uplatnit FLD po předchozí derivatizaci [40; 44; 45].

Při stanovení těchto látek v odpadních vodách je nutné před vlastní analýzou provést prekoncentraci a přečištění vzorku. K těmto účelům se používá extrakce tuhou fází (SPE). Tato metoda je časově náročná a vyžaduje mnoho kroků, avšak pro stanovení látek, vyskytujících se ve velmi nízkých koncentracích, je SPE téměř nepostradatelná. Časové nároky lze snížit on-line spojením SPE a HPLC, při kterém mohou být kondicionace, aplikace vzorku, promývání a eluce uskutečněny automaticky. Výběr vhodného sorbentu a SPE postupu je nutný pro kvantitativní záchyt analytu a také k redukci interferencí z matrice vzorku [40].

#### **2.3.1. Vzorkování**

Jak vyplývá z definice environmentální analýzy, vzorkování představuje kritickou část celého analytického procesu. Vzorkování se může na celkové nejistotě výsledku analýzy podílet až 90 %. Vzorkování by mělo vést k odběru reprezentativního vzorku, který je definován jako taková část materiálu, kde podíly jednotlivých sledovaných složek materiálu a rozdělení hodnot sledovaného znaku odpovídají poměrům ve vzorkovaném celku nebo ve vzorkované části tohoto celku. Při vzorkování vod mohou být odebírány slévané vzorky, které slouží ke zjištění průměrné kontaminace v určitém časovém intervalu, nebo prosté vzorky, které jsou vhodné ke zjištění okamžité kontaminace v určitém čase. Stejně podstatné jako samotný způsob vzorkování je rovněž důležité správné uchovávání vzorků. Složení vody se může s časem měnit v důsledku chemických přeměn, případně reakcí se vzduchem, interakcí vzorku s nádobou apod. Na povrchu skla může také docházet k iontové výměnným reakcím, které mohou měnit koncentrace iontových specií přítomných v roztoku. Rovněž plastové nádoby mohou být zdrojem kontaminace (obzvláště nejsou-li před odběrem vhodně umyté) [62; 63; 64; 65].

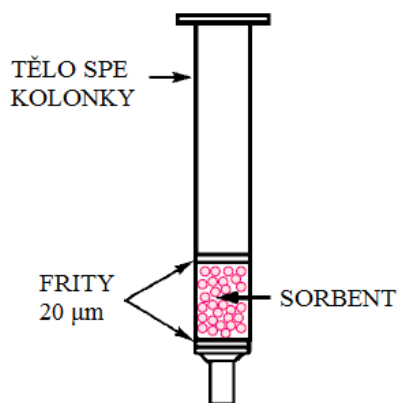
## 2.3.2. Úprava vzorku odpadní vody před analýzou

### 2.3.2.1. *Extrakce kapalina-kapalina LLE*

Extrakční metoda, která je často používána k separaci komponent kapalné směsi, ke koncentraci cílových komponent, případně může být použita jako purifikační stupeň, ve kterém jsou odstraňovány interferenty. Jedná se o transfer rozpuštěné látky z jednoho rozpouštědla do druhého (rozpouštědla musí být nemísitelná nebo pouze částečně mísitelná). Principem je nerovnoměrný distribuční proces, ve kterém jsou analyty obsažené ve vodě převedeny z jednoho rozpouštědla do rozpouštědla druhého. Tato nerovnoměrná distribuce je způsobena různou solubilitou látky v těchto dvou kapalinách; typicky se jedná o fázi vodnou a fázi organickou. Systém po čase dosáhne rovnováhy a fáze, ve které je látka lépe rozpustná, bude obsahovat její větší množství. Základní používanou veličinou je distribuční poměr látky  $K_D$ , jeho hodnota vyjadřuje poměr koncentrace látky v extraktu a koncentrace látky v rafinátu. Distribuční poměr je závislý na teplotě, druhu extrahovaných látek, na použitých rozpouštědlech a také na dalších faktorech, jako je například pH. Tato technika má široké využití, může být realizována v řádech  $\mu\text{l}$  až tun; její hlavní nevýhodou je spotřeba velkých objemů rozpouštědel (pokud nebudeme zahrnovat extrakce v řádech  $\mu\text{l}$ , které nemají tak rozšířené využití) [66].

### 2.3.2.2. *Extrakce tuhou fází SPE*

Používá se pro izolaci, přečištění a zakoncentrování cílových analytů; zakoncentrování je především nezbytné při stopové analýze. Je aplikována v mnoha odvětvích chemie, například v klinické, environmentální a farmaceutické chemii. Byla vyvinuta jako komplementární nebo náhradní metoda k extrakci kapalina-kapalina, a to především z ekonomického hlediska (velká spotřeba rozpouštědel o vysoké čistotě). Jedná se o selektivní distribuci analytu mezi pevný sorbent a kapalnou matici analytu. Výběr vhodného sorbentu a podmínek extrakce je důležitým krokem k získání požadovaných výsledků. Sorbenty se velice podobají těm, které jsou používány v HPLC, jako například silikagel s vázanými fázemi. Uplatňuje se zde celá další řada adsorbentů na bázi grafitu nebo kopolymerů styren-divinylbenzenu. Velikosti částic se pohybují v rozmezí 45–100  $\mu\text{m}$ . Komerčně dostupné jsou v podobě kolonek nebo extrakčních disků; rozměry kolonek jsou různé, nejčastěji 1–6 ml, s průměrem okolo 10 mm, extrakční disky mívají průměr 47 mm. Materiálem kolonek je polypropylen nebo sklo, v kolonce jsou dále umístěny porézní frity z PE nebo PTFE, o velikosti pórů 20  $\mu\text{m}$ . Extrakční disky mají větší extrakční plochu a umožňují tak pracovat s většími průtoky; tím pádem zkracují čas potřebný k této proceduře. Efektivita této techniky je závislá na mnoha faktorech. Jsou jimi: vhodně zvolený typ sorbentu, pH, předčištění vzorku (filtrace, centrifugace), výběr rozpouštědel používaných v promývacím a elučním kroku, průtok v jednotlivých fázích procesu [66; 67; 68; 69].



Obrázek č. 12: Podoba SPE kolonky [67]

### **SPE sorbenty pro systém s obrácenými fázemi**

Zahrnuje polární nebo středně polární matrici vzorku a nepolární stacionární fázi [66].

#### ***Vázané fáze na silikagelu***

Hydrofilní silanolové skupiny na povrchu sorbentu jsou chemicky modifikovány hydrofobním alkylem nebo arylem. Toho je docíleno reakcí s příslušným alkylsilanem; běžně používané alkyly jsou C<sub>8</sub> nebo C<sub>18</sub>. Retence organických analytů z polárních matric (například voda) je způsobena přitažlivými silami mezi uhlovodíkovými vazbami v analytu a funkčními skupinami vázané fáze. Na eluci je potom zapotřebí nepolární solvent, který naruší tyto přitažlivé síly. Uhlovodíkové skupiny mohou být vázány v podobě monomerů nebo polymerů, které zajišťují vyšší pokrytí povrchu silikagelu a vyšší obsah uhlíku. Také jsou více odolné v extrémních hodnotách pH. Všechny tyto sorbenty však disponují určitým procentem nezreagovaných silanolových skupin, které mohou způsobovat sekundární interakce; je to užitečné zejména při extrakci polárních látek, nicméně existuje zde možnost silné ireverzibilní vazby. Pokud používaný nepolární extrakční solvent nedokáže kvantitativně analyt z kolonky vyeluovat, doporučuje se přidání polárního rozpouštědla, jakým je například methanol [67].

#### ***Sorbenty na bázi polymerů***

Poskytují několik výhod: nemají žádné omezení v použití pH, jsou stabilní v rozsahu 0-14, mají vysokou kapacitu, v elučním kroku nevyžadují přítomnost kyselých nebo bazických modifikátorů a jsou makroporézní. Absence volných silanolových skupin; proto jsou bez sekundárních interakcí, vykazují vyšší retenci než vázaný silikagel. Kolonky typu HLB obsahují hydrofilně-lipofilně vyrovnané kopolymery N-vinylpyrrolidon a divinylbenzen a vykazují dobrou retenci pro polární i nepolární analyty. Hydrofilní N-vinylpyrrolidon zvyšuje smáčivost sorbentu vodou a lipofilní divinylbenzen zajišťuje retenci na principu obrácených fází, nutnou ke kvantitativnímu zachytu analytu. Sorbent si zachovává retenci pro analyty i v případě jeho vyschnutí během procedury, což zvyšuje i reprodukovatelnost celé metody [66; 70].

## Molekulárně vtištěné polymery (MIP)

Jsou vysoce selektivní, protože se s nimi dosahuje nižších detekčních limitů a jsou stabilní v širokém rozmezí pH. Jsou navrženy k selektivnímu zachytu pouze jednoho analytu nebo skupiny analytů s podobnou chemickou strukturou. V polymeru jsou formovány speciální kavity, které jsou stéricky a chemicky komplementární s analytem. Vzhledem k tomu, že analyt je v sorbentu silně vázán, tak mohou být aplikovány i silnější promývací činidla, což vede k čistšímu výslednému extraktu. Komerčně dostupné jsou sorbenty pro extrakci PAH z olejů, NSAID z odpadních vod, chloramfenikolu z mléka, plazmy a medu,  $\beta$ -blokátorů z moči a odpadních vod [66; 70].



Obrázek č. 13: Princip selektivity MIP – selektivní vazebná místa sorbentu \* [70]

Dalšími uplatňovanými mechanismy v SPE jsou systémy s normálními fázemi – polární stacionární fáze – buď samotný silikagel, lépe vázané fáze s polárními skupinami jako kyano, amino nebo diol. Pro ionty jsou to potom sorbenty umožňující iontovou výměnu [66; 67].

### SPE postup pro systém s obrácenými fázemi

Zahrnuje pět důležitých kroků, a to selekci vhodné kolonky, kondicionaci sorbentu, nanášení vzorku, promytí a eluci [67].

#### 1. Kondicionace

Prováděna s vodou mísitelnými organickými rozpouštědly, jakými jsou například methanol nebo acetonitril. Ve druhém kroku je nanášeno rozpouštědlo podobných vlastností, jaké bude mít nanášený vzorek. Při extrakci látek z vody se proto volí voda nebo pufr s případnou úpravou pH. Kondicionační krok by měl být pomalý [66; 67].

#### 2. Nanášení vzorku

Nanášeno známého objemu vzorku, které by mělo probíhat rychlostí do 5 ml/min. Pro konkrétní aplikace je nutnost volby ideálního množství sorbentu, aby docházelo ke kvantitativnímu zachytu analytu. Také je nutné zvážit potřebu filtrace nebo centrifugace nanášeného vzorku, a to vzhledem k možnosti ucpání kolonky. Pokud se jedná o polární sloučeniny, jejich ionizovaná/neionizovaná podoba se bude odvíjet od hodnoty pH roztoku. Pro jejich kvantitativní zachyt by měla být hodnota pH upravena pod dvě jednotky  $pK_a$  u kyselin nebo nad dvě jednotky  $pK_a$  u bází [66; 67].

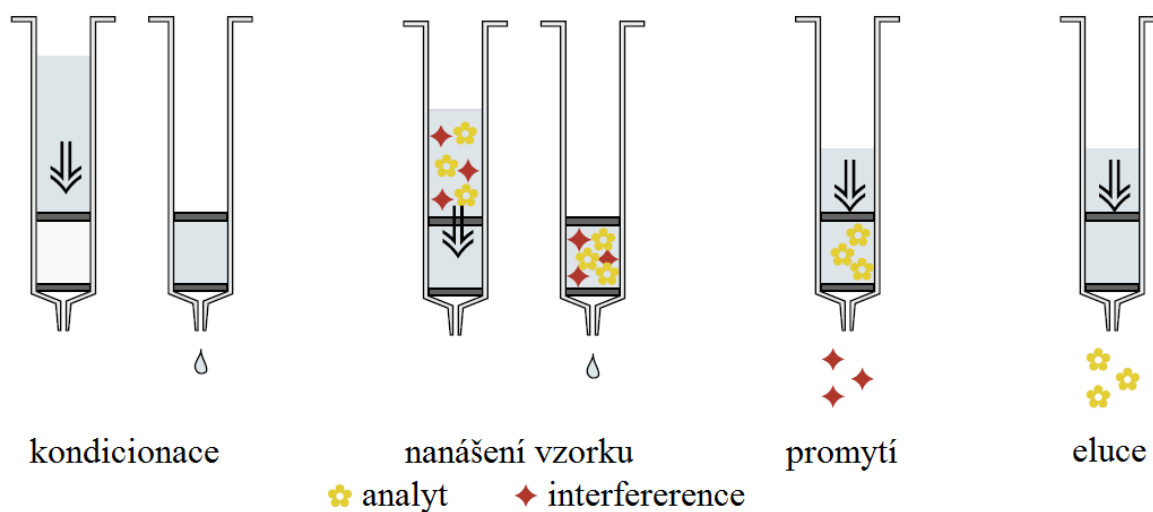
### 3. Promytí

Je důležité k odstranění nechtěných a slabě vázaných interferujících látek. Volba rozpouštědla by měla být následující: vyšší eluční síla než byla matrice vzorku, ale a slabší eluční síla, která je zapotřebí k eluci analytu. Úprava pH promývacího činidla může vést také k pozitivním výsledkům [66; 67].

### 4. Eluce

Prováděna malým objemem rozpouštědla (rozpětí od 200  $\mu$ l po 2 ml, záleží však také na hmotnosti sorbentu). Bylo zjištěno, že eluce dvěma alikvoty rozpouštědla je účinnější než eluce jednokroková. Eluční krok by měl být pomalý [67].

Mezi krokem promývacím a elučním bývá zařazen krok sušení pod vakuem, který odstraňuje nechtěnou zbytkovou vlhkost, tj. vodu ze sorbentu. Důvodem je to, že eluát je následně odpařován pod dusíkem; tento krok může být negativně ovlivněn právě přítomností vody, která je odpařována pomaleji než běžná eluční činidla, jakými jsou methanol nebo acetonitril. Rovněž to může ovlivnit efektivitu eluce; pokud je eluční činidlo nemísitelné s vodou, mohou se například vyskytovat problémy při aplikaci metody GC, aj. [66].



Obrázek č. 14: Obecný SPE postup [71]

## 2.4. Chromatografie

Jedná se o separační techniku, která pracuje na principu rozdílů v hodnotách rovnovážných konstant komponent vzorku ve dvoufázovém systému. Tento systém je složen ze stacionární fáze (SF), přes kterou protéká fáze mobilní (MF). Rychlost průchodu komponent vzorku je ovlivněna jednak samotnou rychlostí mobilní fáze a také rovnovážnou konstantou  $K_D$ , která je charakteristická pro každou látku. Konstanta  $K_D$  vyjadřuje poměr mezi rovnovážnou koncentrací analytu ve stacionární fázi  $c_s$  a rovnovážnou koncentrací analytu ve fázi mobilní  $c_M$  [69; 72; 73; 74].

$$K_D = \frac{c_s}{c_M}$$

Mobilní fáze je tekutina, která by měla splňovat zejména následující kritéria: dobrá rozpustnost pro analyty a malá viskozita. Může se jednat o plyn, kapalinu nebo superkritické fluidum. Role plynu jako mobilní fáze je čistě mechanická, retenční chování analytu je ovlivňováno změnou teploty. V případě použití superkritického fluida jako mobilní fáze je retenční chování závislé na hustotě mobilní fáze (ta je adjustována změnou tlaku) a teplotě. Zcela opačný význam má pak kapalina jako mobilní fáze; ta se aktivně podílí na retenčním chování a selektivitě, a proto je volba jejího složení klíčová. Stacionární fáze může být buď pevná látka, případně kapalina zachycena na pevném nosiči [69; 72; 74].

Je známo mnoho způsobů dělení chromatografie; podle uspořádání to je *kolonová chromatografie* nebo *chromatografie v plošném uspořádání* (papírová, tenkovrstvá). Další dělení je na základě skupenství mobilní a stacionární fáze; toto dělení shrnuje následující tabulka [73].

Tabulka č. 6: Dělení chromatografie dle skupenství mobilní a stacionární fáze [73]

MF	SF	název	zkratka
plyn	kapalina na nosič	plynová rozdělovací chromatografie	GLC
	tuhá látka	plynová adsorpční chromatografie	GSC
kapalina	kapalina (polymer) vázaná na nosiči	kapalinová rozdělovací chromatografie	LLC
	kapalina v pórech sorbentu	gelová permeační chromatografie	GPC
	tuhá látka	kapalinová adsorpční chromatografie	LSC
		iontově výměnná chromatografie	IEC
tekutina v nadkritickém stavu	kapalina (polymer) vázaná na nosiči	chromatografie s mobilní fází v nadkritickém stavu	SFC



### 2.4.1. Plynová chromatografie

Vzhledem ke své vysoké účinnosti by měla být tato separační technika zvažována pro analýzu vždy na prvním místě. Její využití sahá od analýzy permanentních plynů až k ropným produktům, oligosacharidům a tukům. Více jak 80 % prioritních polutantů (EPA) lze stanovit pomocí GC [69; 72; 74].

GC systém se skládá ze zdroje nosného plynu, injektoru, kolony a detektoru. Prostor od injektoru k detektoru je uložen v termostatu. Systém je řízen pomocí počítače, který slouží i jako záznamové zařízení. Nejběžněji používaným nosným plynem je v GC, a to vzhledem k jeho vlastnostem, helium. Podle účelu aplikace se volí kolony náplňové (dnes méně používané) a kolony kapilární. Kapilární kolony jsou křemenné, potažené vrstvou polyimidu, který slouží ke kompenzaci jejich křehkosti. Stacionární fáze jsou chemicky vázané, vesměs to mohou být různé druhy polysiloxanů nebo polyethylenglykol. Retenční čas analytů je ovlivněn teplotou a interakcemi analytu se stacionární fází. Detekce je prováděna pomocí tepelně vodivostního detektoru, plamenově ionizačního detektoru, detektoru elektronového záchytu, hmotnostně spektrometrické detekce atd.; volba vždy záleží na chemických vlastnostech analytu [69; 72; 74].

Tato technika je vhodná jen pro termostabilní sloučeniny. V případě nízké volatility, v důsledku přítomnosti polárních skupin, je východiskem derivatizace, která tyto skupiny blokuje. Příkladem může být derivatizace mastných kyselin, kdy se tyto kyseliny převádějí na jejich methylestery [69; 72; 75].

### 2.4.2. Kapalinová chromatografie

Zahrnuje mnoho technik, ve kterých je mobilní fází kapalina. Stacionární fáze může mít více podob, jak je shrnuto do tabulky č. 6 (viz. strana 32). Selektivita je dána nejenom volbou stacionární fáze, ale také volbou fáze mobilní. V začátcích kapalinové chromatografie byly používány skleněné kolony o průměrech 1–5 cm a délkách 50–500 cm. Průměry částic stacionárních fází se pohybovaly v rozpětí 150–200  $\mu\text{m}$ ; tyto rozměry ještě umožňovaly průchod mobilní fáze gravitačně. S postupem času bylo zjištěno, že vyšší účinnosti lze dosáhnout snížením velikosti částic stacionární fáze, které se dnes pohybují v rozmezí od 1–5  $\mu\text{m}$ . Toto snížení diametru částic má však za následek zvýšení zpětného tlaku systému a průchod mobilní fáze musí být proto zajištěn pomocí čerpadel; takto upravený metodický postup získal označení jako vysokoúčinná kapalinová chromatografie se zkratkou HPLC. Klasická sloupcová chromatografie má v dnešní době význam spíše preparativní [72; 76; 77].

### 2.4.3. HPLC

Je velice frekventovaně používaná technika. Důvodem je především vysoká citlivost, možnost separace nevolatilních, termolabilních látek, látek o vysoké molekulové hmotnosti a polaritě. Její pole působnosti je velice široké, pomocí této metody lze stanovit aminokyseliny, proteiny, nukleové kyseliny, cukry, drogy, léčiva, pesticidy, organokovové sloučeniny a anorganické sloučeniny. Účinnost HPLC kolon je v porovnání s kolonami používanými v GC nízká; tento nedostatek je však částečně vyvažován větší selektivitou [69]. HPLC systém se skládá ze zásobníku mobilní fáze a odplyňovací jednotky, čerpadla, injektoru, kolony, detektoru a data zpracující jednotky [77].

### **2.4.3.1. Uspořádání HPLC**

#### **Zásobník mobilní fáze**

Zásobník poskytuje systému mobilní fázi nutnou k provedení separace, ta je ze zásobníku dopravována úzkými teflonovými nebo polypropylenovými trubičkami k pumpám. Rezervoáry musí být dostatečně čisté a inertní k rozpouštědlům, která jsou uvnitř. Rozpouštědla nesmí obsahovat pevné částice; vyžaduje se použití HPLC „gradient grade“ solventů nebo jejich filtrace přes 0,45  $\mu\text{m}$  filtry. Trubičky k vedení rozpouštědel jsou opatřeny skleněnými fritami, které rovněž brání vstupu pevných částic. Ještě než rozpouštědla vstoupí do čerpadel, je nutné provést jejich odplynění, protože i velmi malé množství vzduchu přítomné v mobilní fázi může způsobovat tlakové fluktuace, které mohou negativně ovlivňovat některé detektory; snižuje se i reprodukovatelnost retenčních časů analytů. Mobilní fáze přechází přes část speciální polymerní trubice-membrány umístěné v evakuované komoře; membrána má selektivní propustnost pro plyny. Další variantou odplynění je potom stripování heliem [77].

#### **Pumpy**

Jsou jedny z nejdůležitějších součástí systému, protože jsou zodpovědné za konstantní průtok mobilní fáze. Změna v průtoku nebo jeho pulzování znamená nemožnost identifikovat analyt na základě retenčního času  $t_R$ , jelikož získané výsledky nejsou reprodukovatelné. Dobré HPLC pumpy by měly být schopny zajišťovat průtok mobilní fáze v rozmezí 0,1–10 ml/min, měly by umožňovat generování vysokých tlaků nad 40 MPa a konstantních průtoků s variacemi do 0,5 % (moderní i do 0,07 %). Dnes však existují i systémy, které jsou schopné generování vyšších tlaků v rozmezí 60–120 MPa s průtoky do 5 ml/min a speciálně se označují jako UHPLC; tento vysoký nárůst tlaku je způsoben používáním částic stacionární fáze menších jak 2  $\mu\text{m}$  (zvýšení účinnosti separace). Pumpy by měly být chemicky inertní a mít snadnou údržbu; proto je jako materiál těla pump používána inertní ocel, písty jsou safírové nebo keramické. Používány jsou reciprokační pístové pumpy s dvěma písty v sériovém uspořádání. Mísení solventů se může odehrávat v nízkotlaké nebo vysokotlaké části [69; 72; 73; 77; 78].

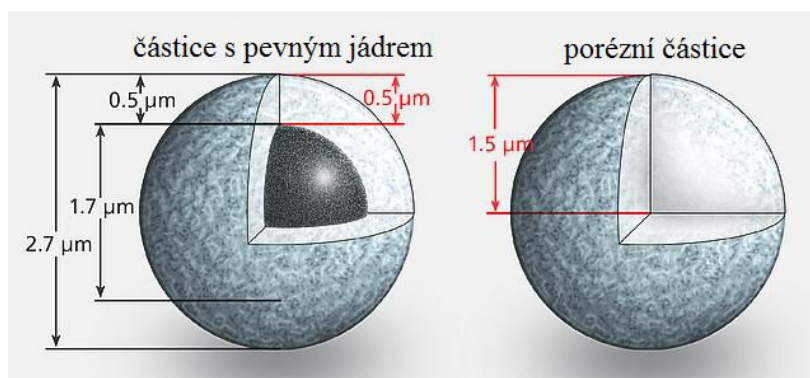
#### **Dávkování vzorku**

Nástřik musí být přesný, precizní a rychlý, zajišťující dodání vzorku v symetrické ostré zóně. Používány jsou dávkovací smyčky nebo častěji autosamplery, mající možnost variabilního objemu nástřiku. Existuje více variant konstrukce autosamplerů, jednou z nich je dávkování pomocí šesticestného ventilu. Mobilní fáze během chodu analýzy protéká přes jehlu k chromatografické koloně; při dávkování je ventil přepnut, mobilní fáze ke koloně teče jinou cestou, jehla je plněna vzorkem, poté je ventil opět přepnut a vzorek z jehly putuje do systému [72; 77; 79; 80].

## Kolona

Ideálním materiálem pro výrobu kolon je sklo, které zaručuje inertnost a dokonalou hladkost svého povrchu. Tyto kolony však odolávají tlakům jen do 5 MPa a pro účely HPLC jsou nepoužitelné. Jako modifikace se dříve objevovaly rovněž skleněné kolony s nerezovým pláštěm. Dnes jsou používány kolony vyrobené z nerezové oceli, o dostatečné inertnosti a odolnosti proti vysokým tlakům. Jejich vnitřní průměr bývá 4,0–4,6 mm, délka 60–250 mm, také jsou dostupné kolony menších průměrů a délek. Pro preparativní účely dosahují kolony délek 900 mm a více [72; 81]. Kolony o vnitřních průměrech 2–4 mm, označované jako narrow bore, a 1–2 mm označované jako microbore, nacházejí vzrůstající uplatnění. Jejich výhoda pramení ze snížení spotřeby mobilní fáze, dosahuje se zlepšení rozlišení v důsledku zmenšené difúze uvnitř kolony a také umožňují relativně snadné spojení s MS [69; 81]. Kolona je uložena v termostatu [69; 78].

Kolony jsou náplňové, velikost částic stacionární fáze se pohybuje v rozmezí 2–5  $\mu\text{m}$ . Větší částice o průměrech 20–50  $\mu\text{m}$  mají uplatnění v preparativní chromatografii a částice menších rozměrů jsou používány v UHPLC z důvodu vysokého nárůstu zpětného tlaku systému [69; 78]. Jako náplň kolon je používán silikagel a jeho modifikace, méně potom alumina a oxid titaničitý. Tyto materiály jsou tlakově stabilní a použitelné v širokém rozmezí pH [72; 78]. Začínají se také objevovat kolony monolitické, které obsahují porézní silikagel tvořící jeden celek (syntetizován in situ). Tento materiál je více propustný pro mobilní fázi, zachovává si vysokou účinnost při vysokých průtocích [69]. Dalším současným trendem je používání částic stacionární fáze s pevným jádrem; benefitem je snížení difúzní dráhy analytu, zvyšuje se účinnost, píková kapacita a rozlišení. Generovaný zpětný tlak je menší v porovnání s tlakem u stejně velkých porézních částic, což umožňuje jejich použití v klasických HPLC systémech [82; 83].



Obrázek č. 15: Rozdíl v difúzní dráze analytu pro částici s pevným jádrem a částicí porézní [82]

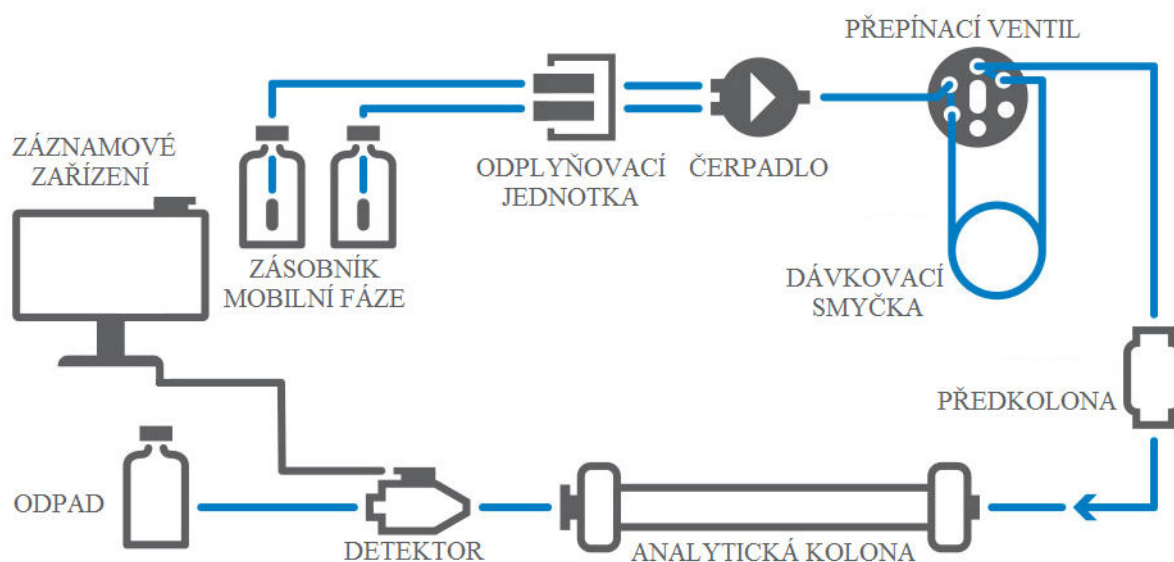
Krátké (cca 0,4–1 cm) a méně finančně náročné kolony jsou často zařazovány v sérii před vlastní analytickou kolonou. Tyto předkolony obsahují stejnou stacionární fázi jako kolona analytická a slouží k její ochraně před znečišťujícími komponentami vzorku, které by snižovaly její životnost [69; 81].

**Silikagel** je používán při chromatografii na normálních fázích a slouží jako základ pro mnoho chemicky vázaných fází. Silanolové skupiny Si-OH jsou zodpovědné za interakce s analytem. Při pH=8 přechází silikagel do roztoku a chromatografické lože je zničeno. Způsobuje silnou retenci bazických sloučenin jako dusíkatých bází [72; 73].

**Chemicky vázané fáze** jsou vyráběny derivatizací silanolových skupin silikagelu. Reziduální silanolové skupiny mohou být odstraněny navázáním trimethylchlorsilanu (TMCS) nebo hexamethyldisilazanu (HMDS); jedná se o tzv. end capping. Výhodou end cappingu je zvýšení životnosti a stability stacionární fáze. Přítomnost reziduálních silanolových skupin způsobuje chvostování píků bazických sloučenin. Jsou dostupné různě vázané fáze, všechny mají stabilní vazbu Si-C, na organickou část mohou být navázány různé polární skupiny jako hydroxy, amino, kyano nebo nitro a jsou používány jak v chromatografii na normálních, tak také na obrácených fázích. Pokud je na silikagel navázána pouze organické sloučeniny (uhlovodíkové řetězce v rozsahu C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>), stacionární fáze je velice nepolární a hydrofobní. Nejčastěji je vázán oktyl nebo oktadecyl [69; 81].

### Detektor a záznamové zařízení

Zaznamenává rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluované složky izolované ze vzorku. Ideální HPLC detektor by měl mít vysokou citlivost a nízký detekční limit, dobrou selektivitu, rychlou odpověď, široký lineární dynamický rozsah, bez příspěvků rozšiřujících chromatografické zóny, spolehlivost, jednoduchou obsluhu, nízkou cenu a dostupnost [72; 73; 79]. Těchto požadavků lze u jednoho detektoru reálně jen těžko dosáhnout. Většina detektorů splňuje pouze část z výše zmíněných vlastností [72; 73]. Vybrané detektory budou podrobněji popsány v následující kapitole. Jako záznamové zařízení běžně slouží počítač [72].



Obrázek č. 16: Zjednodušené uspořádání HPLC [84]

#### 2.4.4. Detektory v HPLC

V následující tabulce jsou uvedeny používané detektory pro HPLC a jejich vlastnosti:

Tabulka č. 7: Základní parametry jednotlivých detektorů používaných v HPLC [72; 73; 79]

Detektor	Typ	Možnost gradientu	Maximální lineární rozsah	Maximální citlivost [g/ml]
UV-VIS	selektivní	ano	$10^3-10^5$	$10^{-9}-10^{-10}$
DAD	selektivní	ano	$10^3-10^4$	$<2 \times 10^{-5}$
RI	univerzální	ne	$10^3-10^4$	$10^{-7}$
Fluorescenční	velice selektivní	ano	$10^2-10^4$	$<10^{-9}$
Amperometrický	selektivní	ano	$10^6$	$10^{-12}$
FTIR	selektivní	ano	$10^4$	$10^{-4}$
ELSD	univerzální	ano	$10^2$	$10^{-9}$
MS	univerzální	ano	$10^2-10^4$	$10^{-9*}$

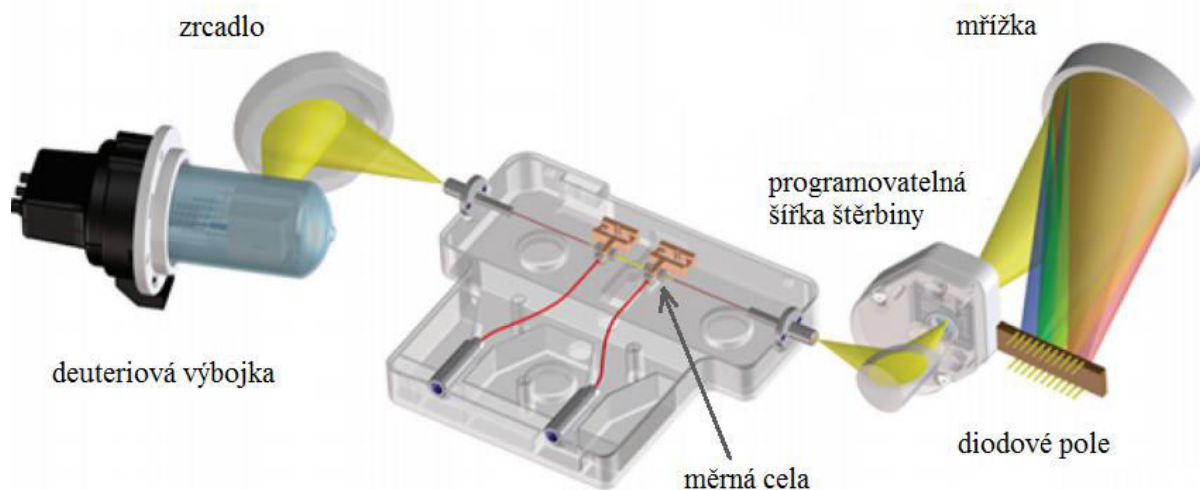
\*bez zahrnutí tandemové MS

##### 2.4.4.1. Spektrofotometrické UV-VIS detektory

Jsou to nejvíce rozšířené detektory používané v HPLC. Mají jednoduchou obsluhu, jsou selektivní a nedestruktivní. Základem je rozdílná absorpce světla analytu a mobilní fáze. Velké množství funkčních skupin absorbuje silně v UV oblasti, například aromatické sloučeniny, karbonylové sloučeniny, alkeny a amidy. Naopak nasycené uhlovodíky, alkoholy a jednoduché cukry absorbují jen slabě nad 200 nm, zatímco některá organická rozpouštědla absorbují silně, například toluen a aceton. Proto je důležitý i vhodný výběr mobilních fází; nevhodný výběr může značně snižovat citlivost detekce. Pokud analyt ve své struktuře neobsahuje žádné chromofory, je detekce s využitím tohoto detektoru nemožná. Východiskem je provedení derivatizace vhodným činidlem, abychom získali sloučeninu schopnou absorpce v UV-VIS oblasti. UV-VIS detektory lze rozdělit do dvou skupin, a to na detektory měřící pouze jednu vlnovou délku nebo detektory měřící celé spektrum (DAD) [72].

##### Detektory s diodovým polem

Tyto detektory umožňují snímání kompletních spekter po celý čas analýzy. Zvyšuje se tak citlivost v případě, pokud se absorpční maxima pro jednotlivé analyzované látky liší. Svazek polychromatického světla je čočkami soustřeďován do průtočné cely a následně pokračuje na difrakční mřížku, kde dochází k rozkladu světla na jednotlivé vlnové délky (rozmezí – šířka štěrbin). Toto světlo dopadá na systém fotodiod. Komerčně dostupné DAD mají běžně 1024 diod na pokrytí 600 nm (rozpětí 190–800 nm). Se snižujícím se počtem diod se rozlišení získaných spekter snižuje. Nedostatkem DAD je, že světlo je děleno na jednotlivé vlnové délky, tím se snižuje jeho intenzita a klesá i citlivost [72].



Obrázek 17: DAD [85]

#### 2.4.4.2. Fluorescenční detektory

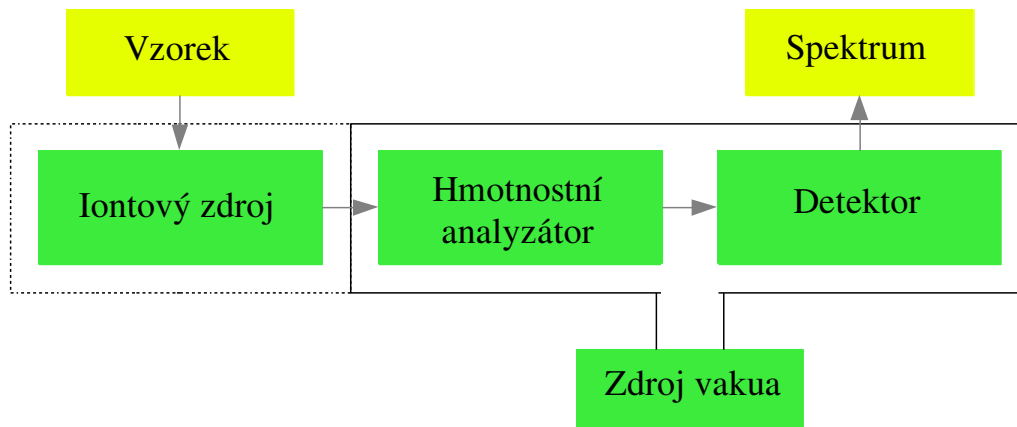
Vyznačují se vysokou citlivostí a selektivitou, a proto jsou vhodné ke stopovým analýzám. Vysoká selektivita je dosahována skutečností, že pouze omezené množství látek je schopné fluorescence. Jsou získávány dva druhy spekter, a to excitační a emisní. Obě dvě spektra jsou charakteristická pro každý analyt a napomáhají značně k jeho identifikaci. Vzorek procházející celou detektorem a je ozářen svazkem světla o určité intenzitě  $I_0$  a excitační vlnové délce  $\lambda_{ex}$ . Fluoreskující analyt je schopen emitovat záření  $I^*$  s charakteristickou vyšší vlnovou délkou  $\lambda_{em}$ , která je zaznamenávána a převáděna na elektrický signál. Protože emitované záření není monochromatické, selektivity lze dosáhnout monochromátorem, nicméně se zvýšením selektivity klesá citlivost. S pomocí před-kolonové nebo post-kolonové derivatizace lze touto technikou měřit i látky, které nejsou schopné fluorescence; v tomto případě lze docílit vysoké selektivity a výborných detekčních limitů [72].

#### 2.4.4.3. Hmotnostně spektrometrická detekce

Jedná se o velice citlivou spektrometrickou metodu, která nabízí kvalitativní uplatnění, při kterém dochází k objasňování struktur neznámých sloučenin, určení molekulové hmotnosti a prvkového složení. Široké uplatnění nachází také v kvantitativní analýze [72; 86].

MS je odlišná od ostatních spektrometrických technik, jakými jsou například IR, UV-VIS a NMR. Všechny tyto techniky jsou založeny na absorpci elektromagnetického záření a transformaci molekul ze základního stavu na stav excitovaný; potom se vrací zpět do stavu základního. Jedná se proto o techniky nedestruktivní. U MS je konverze z iontů zpět na molekuly nemožná, a proto se jedná o destruktivní techniku [87].

Je založena na principu generování iontů z molekul analytu, jejich následnou separaci podle poměru  $m/z$  a detekci. Výsledné hmotnostní spektrum představuje závislost relativního zastoupení produkovaných iontů na  $m/z$ . Hmotnostní spektrometr se skládá z pěti částí: vstup vzorku, iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor a sběr dat (PC). V hmotnostním spektrometru je z důvodu prodloužení střední volné dráhy letu iontů udržováno vysoké vakuum. Vakuum je udržováno v prostoru od iontového zdroje po detektor, případně až za iontovým zdrojem po detektor [86; 87].



Obrázek č. 18: Uspořádání hmotnostního spektrometru [88]

### Spojení HPLC a MS

Spojení těchto dvou technik přináší schopnost separovat a determinovat komponenty komplexních směsí [72; 76]. Je obtížněji dosažitelné, než je tomu u GC. Hmotnostní spektrometrie pracuje pod vysokým vakuem a mobilní fáze z HPLC musí být proto odstraněna [72; 86]. Mezi nejpoužívanější iontové zdroje, vhodné pro spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, patří elektrosprej (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), ty budou dále popsány podrobněji [72; 86].

### Vakuový systém

Generování dostatečného vakua v systému je nedílnou součástí MS. Požadovaná míra vakua se odvíjí od použitého hmotnostního analyzátoru, hodnoty bývají v rozmezí  $10^{-3}$ – $10^{-11}$  Pa. Se zvyšujícím se vakuem vzrůstá střední volná dráha molekul/iontů, a proto pro analyzátory, ve kterých ionty urazí delší vzdálenosti, je zapotřebí vyššího vakua. K dosažení vakua jsou používány dvoustupňové čerpací systémy. V prvním stupni jsou používány rotační olejové pumpy a ve druhém potom turbomolekulární nebo difúzní pumpy [89].

## Iontový zdroj

Ionizace analytu může být provedena mnoha způsoby, a to v závislosti na skupenství analyzovaného vzorku a chemických vlastnostech analytů [89].

Tabulka č. 8: Dělení ionizačních technik [89]

skupenství	ionizační technika	
	měkká	tvrdá
plynné	CI	EI
pevné	MALDI	-
kapalné	ESI, APCI, APPI	-

Pro ionizaci z plynného stavu (vhodné pro spojení GC/MS) je používána **elektronová ionizace (EI)**, kde přicházejí molekuly analytu do styku s elektrony o určité energii. Vzhledem ke své dobré reprodukovatelnosti je proto možné vytváření knihoven spekter a porovnávání spekter neznámých látek se spektry uloženými v knihovnách (produkováno velké množství fragmentových iontů vzhledem k vysoké energii elektronů). Další možností je **chemická ionizace (CI)**, kde jsou molekuly analytů ionizovány prostřednictvím iontů utvořených z molekul reakčního plynu (ty vznikají interakcí elektronů s reakčním plynem). Reakční spíše nejčastěji předává molekule analytu proton za vzniku kvazimolekulárního iontu  $[M+H]^+$ . Jako reakční plyn je používán methan nebo ethan; tato ionizace patří mezi měkké ionizační techniky, a proto zde není možnost vytváření knihovny spekter. Jedním z rozdílů těchto dvou technik je také to, že EI na rozdíl od CI produkuje pouze kladně nabitě ionty, zatímco CI produkuje ionty kladné i záporné. Může se stát, že molekulové ionty některých látek nejsou ve spektru poskytnutém z EI viditelné, což může být způsobeno jejich nestabilitou; informace o molekulové hmotnosti je proto nedostupná. CI je potom vhodnou doplňkovou technikou, protože v jejím spektru lze nalézt kvazimolekulární iont a určit z něj molekulovou hmotnost. Pro ionizaci z pevného stavu je používána technika **laserové desorpce za asistence matrice (MALDI)** [87; 90].

## Ionizace z kapalného stavu

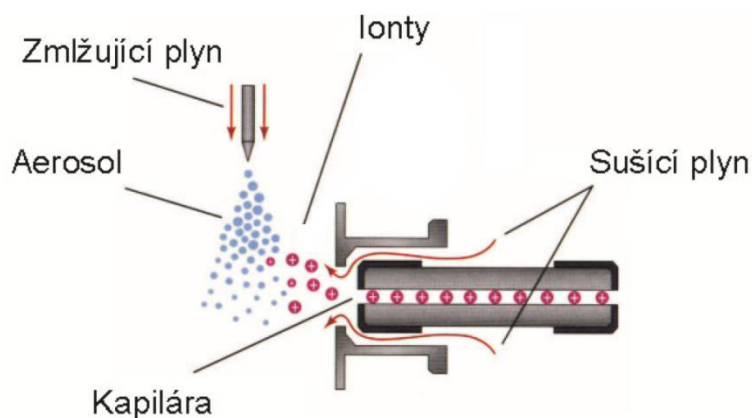
### Elektrosprej

Technika umožňující vypařování iontů přítomných v roztoku. Existuje velké množství nevolatilních nebo termicky labilních sloučenin, které mají kyselé nebo bazické funkční skupiny; právě pro tuto skupinu sloučenin je elektrosprej vhodný. Je schopen vypařovat z roztoku látky o vysoké molekulové hmotnosti a mnohonásobně je nabíjet. Z tohoto důvodu je použitelný pro biomolekuly, jakými jsou především peptidy, proteiny, cukry a mnohé další [72; 81; 90].

Mezi kovovou kapilárou a vstup do analyzátoru je aplikován potenciál 2–3 kV. Polarita kapiláry se volí na základě toho, jaké ionty mají být detekovány. Pro kladné ionty je kapilára udržována na kladném potenciálu, pro záporné ionty naopak na záporném potenciálu. Vysoký kladný potenciál aplikovaný na kapiláru zapříčiňuje silné přitahování záporných iontů

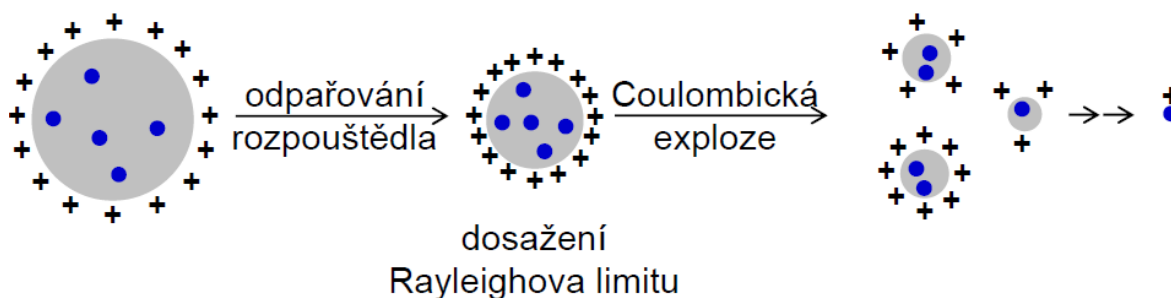


k vnitřnímu povrchu kapiláry; mezitím jsou kladné ionty odpuzovány a soustřeďují se ve středu kapiláry (na její ose). Ionty potom postupují dál až k ústí jehly. Vznikající kapénky obsahují přebytek kladných iontů. Pokud je na kapiláře záporný potenciál, je situace zcela opačná; nabité kapénky obsahují přebytek iontů záporných. Zavedením zmlžovacího mechanismu (jako zmlžovací plyn je používán dusík) je umožněno pracovat s průtoky mobilní fáze většími než 0,2 ml/min a také je možné použít větší procento vody v mobilní fázi. Protiproud sušícího plynu (také dusík) slouží k odpařování rozpouštědla ze vzniklých kapének, jeho teplota se pohybuje okolo 350 °C [91; 72; 81]



Obrázek č. 19: Elektrosprej [89]

Možných mechanismů vzniku iontů z aerosolu je popsáno více. Jedním z nich je **Ion evaporation**. Postupným odpařováním mobilní fáze se kapénky stávají menší a menší, repulzní síly nakonec překonají síly udržující kapénky pohromadě (povrchové napětí) a dochází ke Coulombické explozi, při které postupně vznikají kapénky menší. Tento proces se neustále opakuje, až nakonec vzniknou samostatné ionty [91; 72; 81].



Obrázek č. 20: Proces vzniku iontů z nabitých kapének mechanismem Ion evaporation [89]

## Analyzátory

Mají za úkol separovat ionty na základě poměru jejich hmotnosti a náboje  $m/z$ . Pracují na podkladě některých fyzikálních principů, jako je oscilace v elektrickém poli, doba letu, odchýlení trajektorie v magnetickém nebo elektrickém poli a absorpce energie při cykloidálním pohybu v magnetickém a elektrickém poli [92]. Dají se rozdělit na základě jejich rozlišovací schopnosti, kterou se rozumí schopnost přístroje rozlišit dva sousední ionty o stejné intenzitě [93].

$$RP = \frac{m_1}{m_2 - m_1}$$

Tímto způsobem se dá vypočítat rozlišovací schopnost (RP) pro dva sousední píky s hmotami  $m_1$  a  $m_2$ , které mají stejnou intenzitu a překrývají se v 10 % výšky. Jinou variantou je poměr hmoty iontu k jeho šířce v 50 % výšky [93].

Tabulka č. 9: Dělení hmotnostních analyzátorů na základě jejich rozlišovací schopnosti [92]

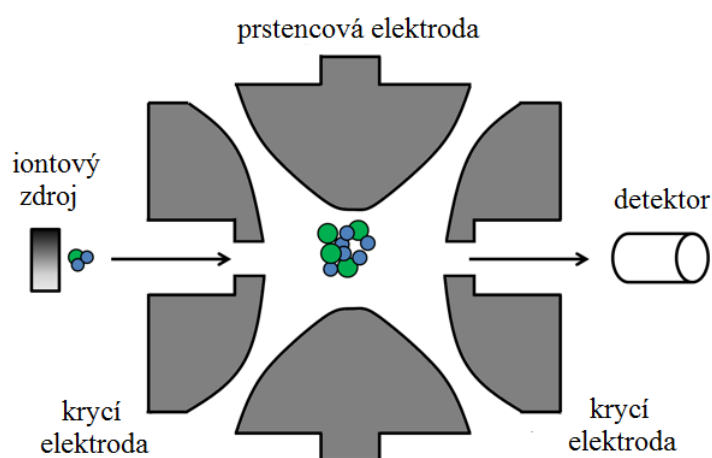
Nízké rozlišení RP do 5 000	Kvadrupól Iontová past sférická, lineární Analyzátor doby letu
Střední rozlišení RP 5 000 - 10 000	Analyzátor doby letu s reflektorem Kvadrupól s hyperbolickým profilem tyčí Iontová past sférická v zoom scanu
Vysoké rozlišení RP 10 000 a více	Sektorové s dvojí fokusací FT-ICR Orbitrap Analyzátor doby letu s reflektorem

### Iontová past sférická

Pracuje v cyklickém režimu a patří do kategorie dynamických analyzátorů, u kterých jsou trajektorie iontů ovlivněny silou měnící se s časem [94]. Jedná se o zařízení schopné uchovávat ionty. Pracuje pouze s elektrickým polem, má nižší rozlišení, avšak cenově je dostupnější. Skládá se z centrální prstencové elektrody a dvou elektrod krycích. Krycí elektrody obsahují otvory pro přívod iontů a jejich e젝ci k detektoru. Na prstencovou elektrodu je vkládáno střídavé radiofrekvenční (Rf) napětí; krycí elektrody jsou uzemněny (toto nastavení umožňuje stabilizaci iontů cca do 650  $m/z$ , pro stabilizaci větších iontů je nutné přídavné Rf napětí na krycích elektrodách. Po napuštění pasti jsou ionty kolizně ochlazeny heliem (tlak  $10^{-3}$  Torr) a soustředěny v centrální oblasti. Na prstencové elektrodě se postupně zvyšuje Rf napětí, ionty začnou cirkulovat po stabilních trajektoriích. Zvyšování Rf napětí postupně destabilizuje trajektorie iontů od nejlehčích po nejtěžší, ionty postupně opouštějí prostor pasti a pokračují k detektoru. Kapacita iontové pasti je limitována, neboť při

větším množství iontů dochází ke vzniku prostorového náboje, který interferuje s generovaným elektrickým polem, a proto je nezbytné optimalizování intervalu napouštění (prováděno automaticky) [72; 76; 86; 94; 92].

Velkým benefitem je potom možnost provádění tandemové hmotnostní spektrometrie v čase. Hlavní výhodou tandemové spektrometrie je minimalizace chemického šumu, a proto je dosahováno nižších limitů detekce. Místo postupného skenování všech přítomných iontů je v pasti ponechán jen jeden prekursor; ten je kolizně aktivován s terčovým plynem (helium). Na krycí elektrody je vloženo rezonanční Rf napětí, kolize s heliem se stávají energetické, dochází k fragmentaci a vzniklé fragmenty pak mohou být skenovány, případně je z nich vybrán další prekursor a je provedena  $MS^3$ . Tyto kroky se mohou několikrát opakovat. Největší praktické využití má však  $MS^2$  [92].



Obrázek č. 21: Iontová past sférická [95]

## Detektor

Konvertuje svazek iontů na elektrický signál, který je dále zpracováván. K těmto účelům se používá elektronový násobič [76; 87].

**Elektronásobič s diskrétním dynodovým systémem** obsahuje systém dynod, z nichž každá je držena na určitém napětí (postupně se zvyšujícím napětí); povrch dynod je z Cu/Be, ze kterého je při srážce s energickým iontem nebo elektronem vyražen proud elektronů. **Elektronásobič s kontinuálním systémem dynod** má tvar rohu (trubky), je ze skla s vysokým obsahem olova. Napříč celou délkou detektoru je vložen potenciál 1,8–2 kV. Ionty dopadají na povrch nedaleko vstupu, vyrazí z povrchu elektrony, které po povrchu dále přeskakují a s každým nárazem vyrazí další elektrony. Mohou být umístěny přímo za výstup z magnetických sektorových analyzátorů, protože emitované ionty mají dostatek kinetické energie na vyražení elektronů při jejich střetu s detektorem. Mohou být však použity rovněž s kvadrupóly, avšak ionty musí být nejdříve urychleny [76; 87].

**Jako záznamové zařízení** slouží většinou počítač; analogový signál z elektronásobiče (kontinuálně se měnící proud nebo napětí) je digitalizován [87].

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Přístroje a pomůcky

Analytické váhy HR-120-EC, a & D Instruments Ltd.

Přístroj pro přípravu milli-Q vody Millipore QGARD, Academic

pH metr InoLab WTW series, Nameko, ČR

Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series

- Kolona Kinetex C18 délka 150 mm, vnitřní průměr 3 mm, velikost částic 2,6  $\mu\text{m}$
- Kolona Discovery ZR-PBD délka 150 mm, vnitřní průměr 2,1 mm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$
- Kolona Ascentis Express HILIC délka 150 mm, vnitřní průměr 2,1 mm, velikost částic 2,7  $\mu\text{m}$

Hmotnostní spektrometr Agilent Ion Trap 6320 LC/MS

Infuzní pumpa kdS 9100, kdScientific

Generátor dusíku Peak Scientific

Ultrazvuková vodní lázeň Kraintek 5

Přístroj pro sušení pod dusíkem Evaterm, LABICOM s. r. o.

SPE extraktor SUPELCO a J. T. Baker

Vakuová pumpa KNF LAB LABOPORT

SPE kolonky:

- Supel Select HLB 200 mg, 6 ml
- Oasis PRiME HLB 60 mg, 3 ml
- Supelclean™ ENVI – 18 500 mg, 6 ml

Filtry:

- Filtry se skleněnými vlákny NM GF 1, průměr 55 mm, Macherey-Nagel, Německo
- Stříkačkové filtry Cronus PTFE, 0,45  $\mu\text{m}$ , průměr 13 mm
- Munktell papírový filtr, průměr 125 mm, plošná hmotnost 84 g/m<sup>2</sup>

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

#### 3.2. Používaný software pro zpracování dat

MS Excel 2007

MS Word 2007

Chemstation for LC 3D systems Rev. B.01.03-SR2

6300 Series TrapControl Version 6.2

6300 Series DataAnalysis Version 6.2

### **3.3. Použité chemikálie a standardy**

#### **3.3.1. Chemikálie**

Acetonitril – HPLC Far UV/Gradient Grade, J. T. Baker

Acetonitril – LC-MS Chromasolv® o čistotě  $\geq 99,9$  %, Sigma Aldrich

Kyselina mravenčí o čistotě  $\geq 98$  %, Sigma Aldrich

Amoniak – vodný roztok, min. 25 %, p. a., Lach-Ner, s. r. o.

Octan amonný o čistotě  $\geq 99$  %, p. a., Fluka

#### **3.3.2. Plyny**

Dusík – 4.7 Siad Czech spol. s. r. o.

Helium – 6.0 Linde gas a. s.

#### **3.3.3. Standardy**

Azithromycin dihydrate – Dr. Ehrenstorfer GmbH, čistota 97 %

Clarithromycin – Dr. Ehrenstorfer GmbH, čistota 99 %

Erythromycin – Sigma Aldrich, čistota  $\geq 90$  %

Roxithromycin – Sigma Aldrich, čistota  $\geq 90$  %

### **3.4. Sledovaná matrice**

Odpadní voda odebraná z ČOV Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, přítok a odtok.

Odpadní voda odebraná z velkokapacitní ČOV Brno-Modřice, přítok a odtok.

Odpadní voda odebraná z ČOV Mikulov, přítok a odtok.

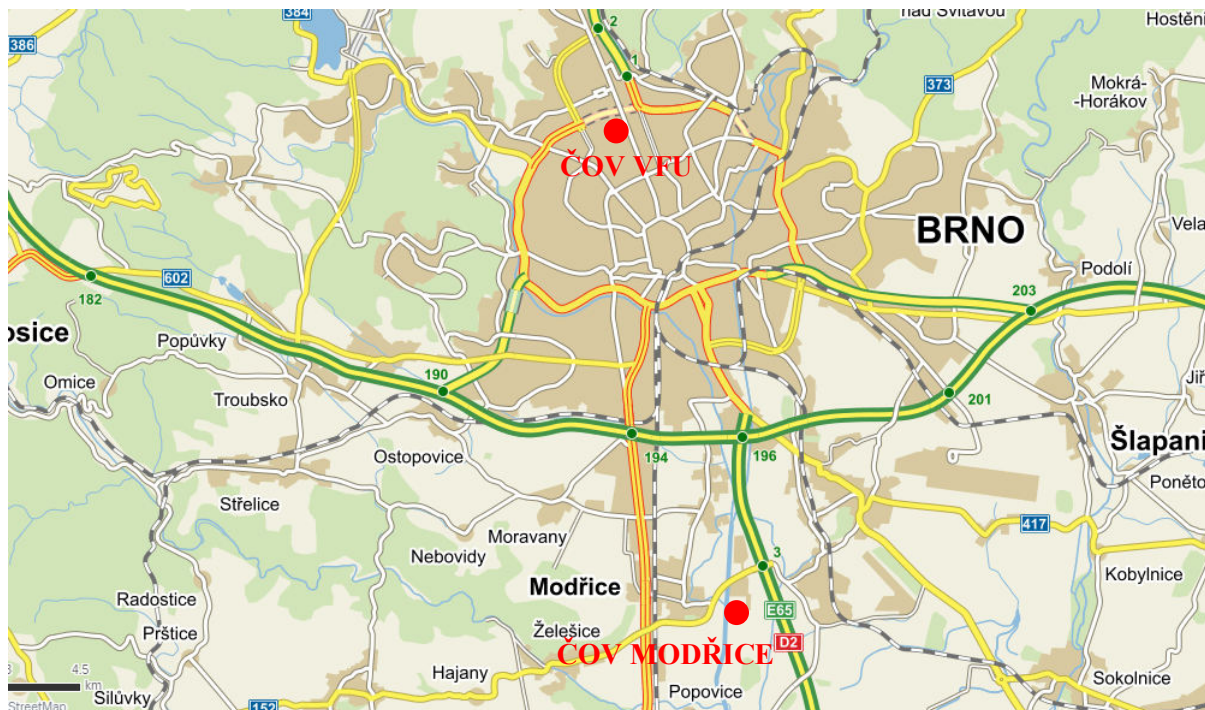
#### **3.4.1. Technologická specifikace ČOV VFU Brno**

Slouží pro předčištění a hygienizaci odpadních vod produkovaných v celém areálu univerzity. V prvním stupni je voda zbavena hrubých nečistot a pokračuje do usazovací nádrže, kde je sedimentován primární kal. Dále pak voda vstupuje do aktivační nádrže s provzdušňováním a potom pokračuje do dosazovací nádrže. Sedimentovaný aktivovaný kal je vrácen zpět do aktivační pro zajištění dostatečného množství aktivní biomasy. Voda je následně dezinfikována chlorem v množství 180 mg/h. Takto ošetřená voda odtéká do stokové sítě města Brna. Primární kal je sterilizován ve sterilizátoru při teplotě 125 °C po dobu 35 min, následně je kal ochlazen na teplotu v rozsahu 30-40 °C a vypuštěn do kanalizace [96].

#### **3.4.2. Technologická specifikace ČOV Brno - Modřice**

Jedná se o mechanicko - biologickou čistírnu s maximální kapacitou 515 000 EO a maximálním přítokem 137 000 m<sup>3</sup> odpadní vody za den. Primární mechanické čištění sestává z lapáku šterku, česlovny a lapáku písku s provzdušňováním k odstraňování tuků na principu flotace. Za lapáky písku je umístěn automatický vzorkovač. Voda dále natéká do usazovacích nádrží, kde dochází k sedimentaci primárního kalu, ten pak dále pokračuje na předzahuštění. Biologický stupeň se skládá z aktivační s předřazenou denitrifikací a anaerobní defosfatací. Rovněž zde probíhá chemické srážení fosforu železitou solí. Voda prošlá procesem aktivační pokračuje do dosazovacích nádrží, kde je oddělována finální vyčištěná voda od aktivovaného kalu. Vyčištěná voda prochází přes zařízení monitorující průtok do recipientu (řeka Svratka); na tomto místě je umístěn i automatický vzorkovač. Část kalu

(vratný kal) je vracena zpět do aktivace k dosažení optimální koncentrace aktivní biomasy. Zbylá část kalu (kal přebytečný) je vedena do předzahuštění. Po homogenizaci primárního a přebytečného kalu putuje kal s obsahem sušiny 5 % do vyhnívacích nádrží. Vyhníly kal se sušinou 3,5 % je veden na odstředivky, kde probíhá jeho odvodnění na kal s obsahem sušiny 25 %. Tento odvodněný kal je buď transportován do kontejnerů a odvážen ke kompostování nebo je veden do sušárny, kde dochází k jeho sušení při 105 °C. Při této teplotě již probíhá pasterizace a hygienizace a produktem je kal s obsahem sušiny 85-92 %. Bioplyn vznikající ve vyhnívacích nádržích je veden do plynojemů a po jeho odsíření je spalován v plynových motorech instalovaných v areálu ČOV [97; 98].



Obrázek č. 22: Poloha ČOV VFU a ČOV Brno – Modřice

### 3.4.3. Technologická specifikace ČOV Mikulov

Tato čistírna rovněž pracuje na mechanicko-biologickém principu; její maximální kapacita je 24 850 EO a maximální přítok 5 184 m<sup>3</sup>/den. Mechanický stupeň se skládá z lapáku šterku, česel a lapáku písku. Voda pak pokračuje do čtyřkomorového anoxického selektoru a z něho do prostoru aktivace s jemnobublinnnou aerací. K odstranění fosforu je dávkováno srážedlo buď do místa před aktivací, nebo do místa před dosazovací nádrží. Voda prošlá aktivací natéká následně do dosazovacích nádrží, kde probíhá sedimentace aktivovaného kalu. Část aktivovaného kalu je vracena zpět do první komory selektoru a část je vedena jako přebytečný kal k zahuštění. Odsazená voda je následně vedena na bubnový mikrofiltr, který tvoří terciární část čistícího procesu. Potom vyčištěná voda odtéká do recipientu. Kal je dále veden do akumulacních nádrží, kde dochází k jeho provzdušňování a hygienizaci; následuje odvodnění na odstředivce a jeho transport na deponii v areálu ČOV [99; 100].





Obrázek č. 23: Poloha ČOV Mikulov

### 3.5. Postup stanovení

#### 3.5.1. Odběry vzorků

V průběhu měsíce dubna bylo provedeno několik odběrů vzorků vody z výše popsaných ČOV; vždy se jednalo o vzorek z přítoku a odtoku. Následující tabulka shrnuje odběrové dny a typy vzorků u jednotlivých ČOV.

Tabulka č. 10: Charakterizace odběrových dní a typů vzorků

ČOV	Datum odběrů	Typ vzorku
VFU Brno	7. 4. 2016	prostý
Brno – Modřice	19. 4. – 29. 4. 2016	slévaný 24 hodinový
Mikulov	20. 4. a 27. 4.	slévaný 24 hodinový

Vzorky byly skladovány v tmavých skleněných vzorkovnicích o objemu 1 l a do doby zahájení analýzy byly uchovány při teplotě 4 °C. Analýza vzorků proběhla nejpozději do 48 hodin od jejich odběru.

#### 3.5.2. Úprava vzorku před izolací sledovaných analytů

Před vlastní SPE extrakcí bylo nutné odstranit ze vzorku vody suspendované pevné částice. Pro přítok byla nejprve provedena filtrace přes papírový filtr a následně filtrace přes filtry se skleněnými vlákny. U vody odebrané na odtoku byla filtrace provedena pouze přes filtry se skleněnými vlákny. Po filtraci bylo pH vzorku upraveno roztokem amoniaku na hodnotu 7.

### 3.5.3. Izolace sledovaného analytu

Pro izolaci analytu z matrice odpadní vody byla provedena extrakce na tuhou fázi (SPE). Pro extrakci byly použity kolonky Supel Select HLB 200 mg/6 ml.

#### **Optimalizovaný SPE postup:**

<b>kondicionace</b>	5 ml acetonitrilu 5 ml 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ o pH ~ 7
<b>nanesení vzorku</b>	200 ml o pH ~ 7
<b>promytí</b>	3 ml milli-Q vody o pH ~ 7
<b>sušení</b>	proudem vzduchu 15 minut
<b>eluce</b>	2×2 ml acetonitrilu
<b>sušení</b>	pod dusíkem
<b>rozpuštění</b>	1 ml acetonitrilu



Obrázek č. 23: SPE extrakce, fáze nanášení vzorku



### 3.5.4. Identifikace a kvantifikace analytu

Pro identifikaci a kvantifikaci vybraných makrolidových antibiotik byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí; ionizační technikou byl elektrosprej, analyzátozem sférická iontová past. Analyty byly separovány na koloně Ascentis Express HILIC o rozměrech 2,1 x 150 mm a velikosti částic 2,7 µm. Kvantifikace analytu proběhla metodou kalibrační přímky.

<b>HPLC podmínky:</b>	
<b>MF</b>	A: 10 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> pH=6,7 B: acetonitril
<b>průtok</b>	0,60 ml/min
<b>nástřik</b>	2,5 µl
<b>gradient</b>	viz. tabulka níže
<b>teplota kolony</b>	50 °C
<b>délka analýzy</b>	6 min + 5 min ekvilibrace kolony
<b>MS podmínky:</b>	
<b>tlak zmlžovače</b>	35 psi
<b>průtok sušícího plynu</b>	12 l/min
<b>teplota sušícího plynu</b>	350 °C
<b>ionizační mód</b>	pozitivní
<b>scan</b>	500-1000 m/z

Tabulka č. 11: Průběh gradientu mobilní fáze

Čas [min]	A [%]	B [%]
0	20	80
3	20	80
5	50	50
6	20	80

Tabulka č. 12: Retenční časy a charakteristické hmoty pro jednotlivé analyty

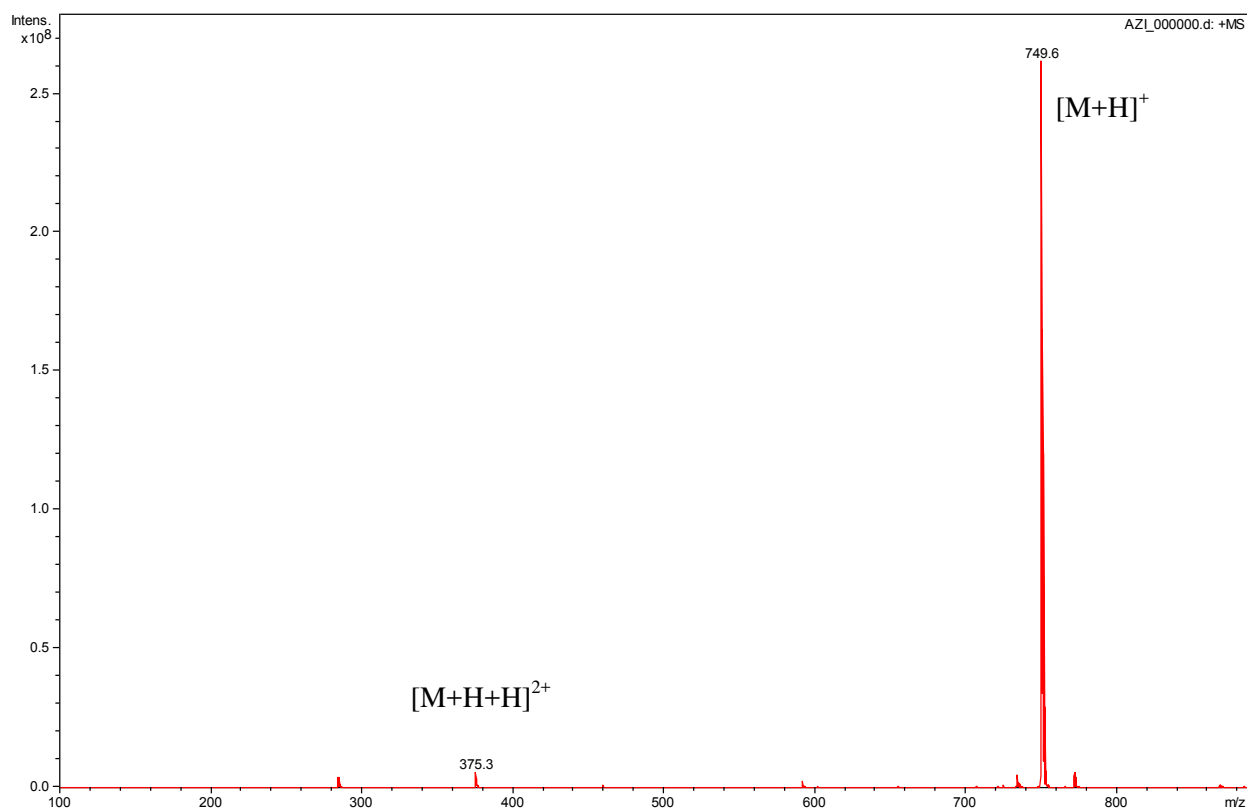
Analyt	R <sub>T</sub> [min]	m/z
ROX	2,7	837,6
KLA	2,8	748,5
AZI	2,8	749,6
ERY	3,0	734,5

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1. Určení sledované charakteristické hmoty pro jednotlivé analyty

K tomuto zjištění byl nejdříve proveden přímý nástřik jednotlivých analytů o koncentraci 10 µg/ml na hmotnostní spektrometr za pomoci infuzní pumpy. Jako vhodné rozpouštědlo byl použit acetonitril.

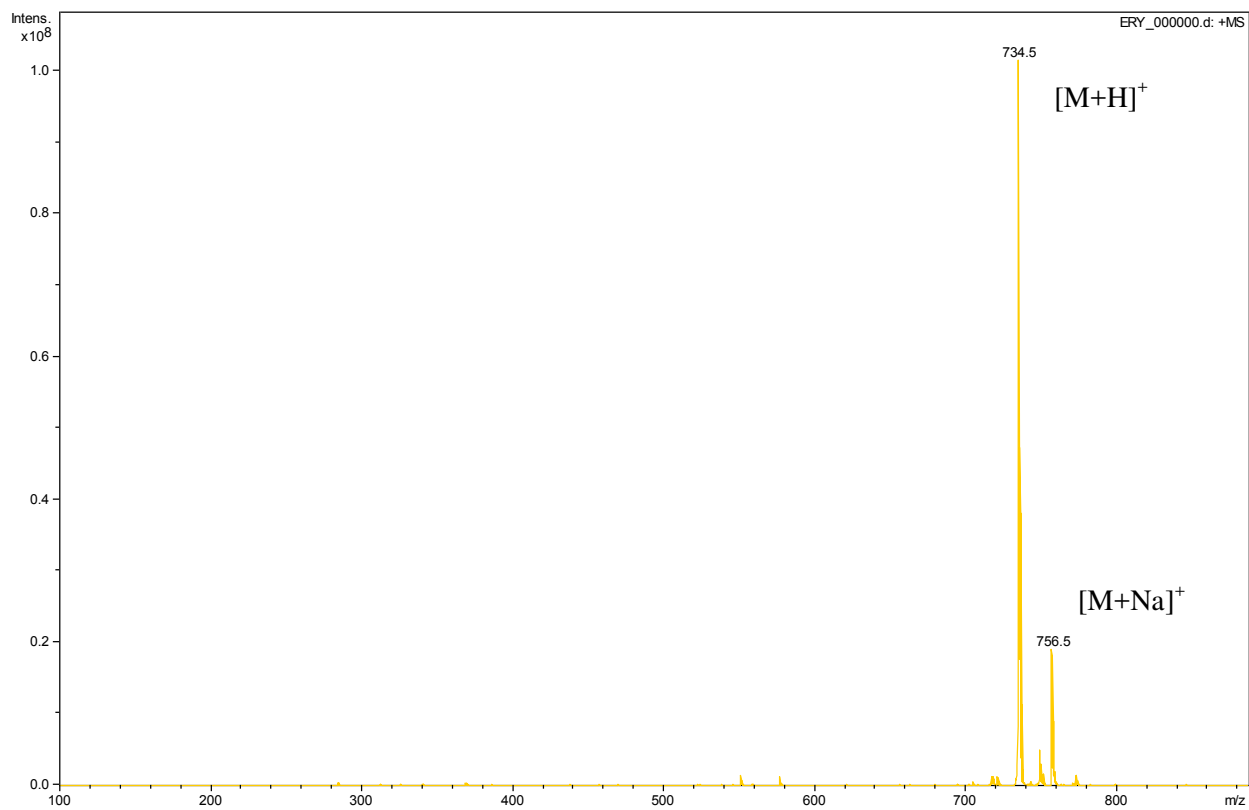
MS podmínky	
průtok	5 µl/min
tlak zmlžovače	7 psi
průtok sušícího plynu	10 l/min
teplota sušícího plynu	350 °C
ionizační mód	pozitivní
scan	100-900 m/z



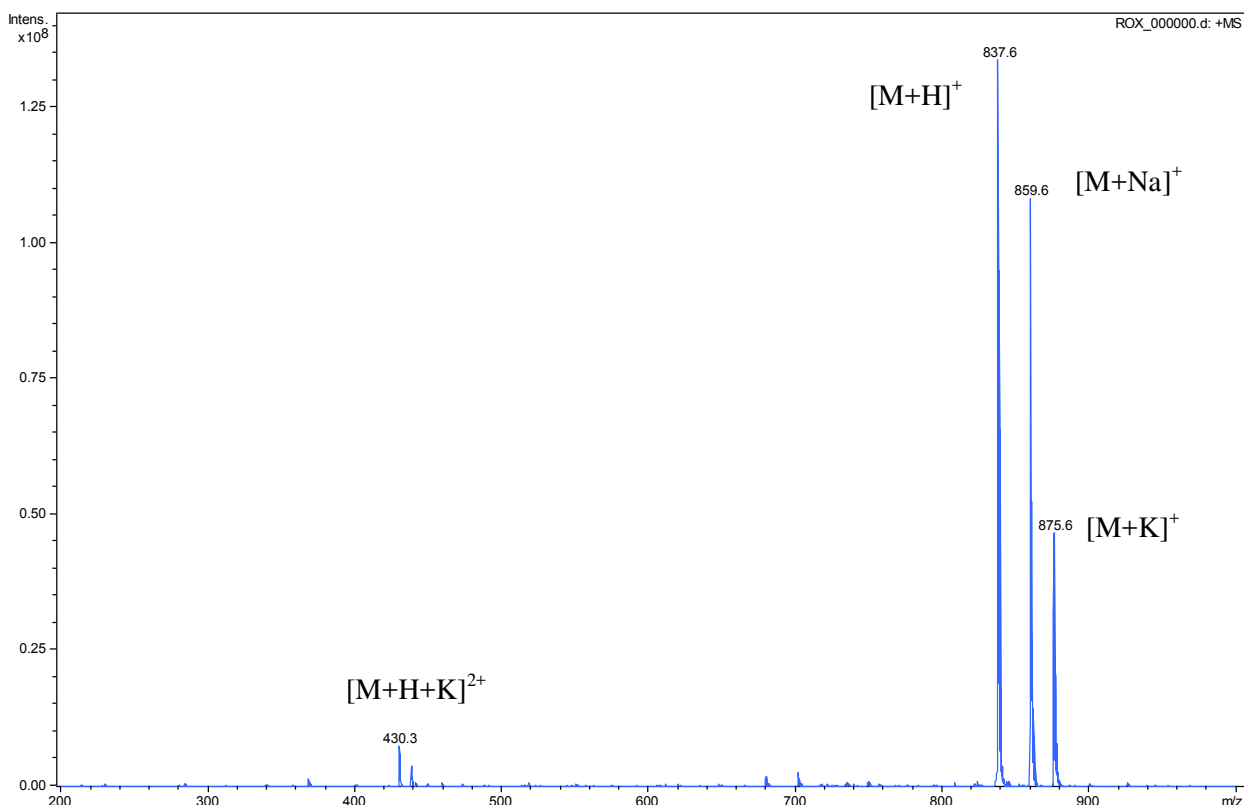
Obrázek č. 25: Hmotnostní spektrum azithromycinu



Obrázek č. 26: Hmotnostní spektrum klarithromycinu



Obrázek č. 27: Hmotnostní spektrum erythromycinu



Obrázek č. 28: Hmotnostní spektrum roxithromycinu

Pro každý analyt byla vybrána charakteristická hmota  $m/z$  představující jejich kvazimolekulární iont  $[M+H]^+$ .

## 4.2. Optimalizace chromatografických podmínek

### 4.2.1. Výběr vhodné kolony

#### 4.2.1.1. Kolona Discovery ZR-PBD, 150 × 2,1 mm, 5 μm

Pracuje na principu obrácených fází. Stacionární fázi tvoří sférické částice oxidu zirkoničitého, na kterém je chemicky vázán polybutadien. Tento druh stacionární fáze je schopen odolávat vysokým teplotám až do 150 °C, stabilní je v rozmezí pH 1–13 a je použitelná do tlaku 310 barů. Částice stacionární fáze generují menší zpětný tlak než je tomu u částic na bázi silikagelu; rozdíl je v ploše aktivního povrchu. Tak je možné pracovat s vyššími průtoky mobilní fáze a snižovat délku analýzy. Jako organická složka mobilní fáze je více doporučován acetonitril než methanol, důvodem je poskytování vyšší účinnosti separace. Jako vodná složka jsou pro spojení LC-MS doporučovány pufrы jako octan amonný nebo amoniak. Tato kolona je zvláště vhodná pro bazické sloučeniny, a to z důvodu možnosti pracovat za vysokých hodnot pH; rovněž nezpůsobuje chvostování píků bazických sloučenin, jako tomu bývá u stacionárních fází založených na vázaném silikagelu (reziduální silanolové skupiny mohou u bází vyvolat sekundární interakce projevující se právě chvostováním) [101]. Na základě těchto poznatků a chemických vlastností stanovovaných analytů byla tato kolona zvolena jako vhodná pro ověření.

**HPLC podmínky:**

<b>MF</b>	A: 10 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> o pH 7,6 nebo 10 mM NH <sub>3</sub> o pH 9,5
	B: acetonitril
<b>průtok</b>	0,20 ml/min
<b>nástřik</b>	2,5 µl
<b>teplota kolony</b>	30 °C

**MS podmínky:**

<b>tlak zmlžovače</b>	20 psi
<b>průtok sušícího plynu</b>	10 l/min
<b>teplota sušícího plynu</b>	350 °C
<b>ionizační mód</b>	pozitivní
<b>scan</b>	100-900 m/z

Bylo provedeno několik experimentů, při kterých bylo měněno složení mobilní fáze a její gradient. Ani jedno z měření nepřineslo pozitivní výsledky, protože analyty na koloně nevykazovaly žádnou retenci. Z těchto důvodů bylo nutno vyzkoušet další kolonu s jiným druhem stacionární fáze.

**4.2.1.2. Kolona Kinetex C18, 150 × 3 mm, 2,6 µm**

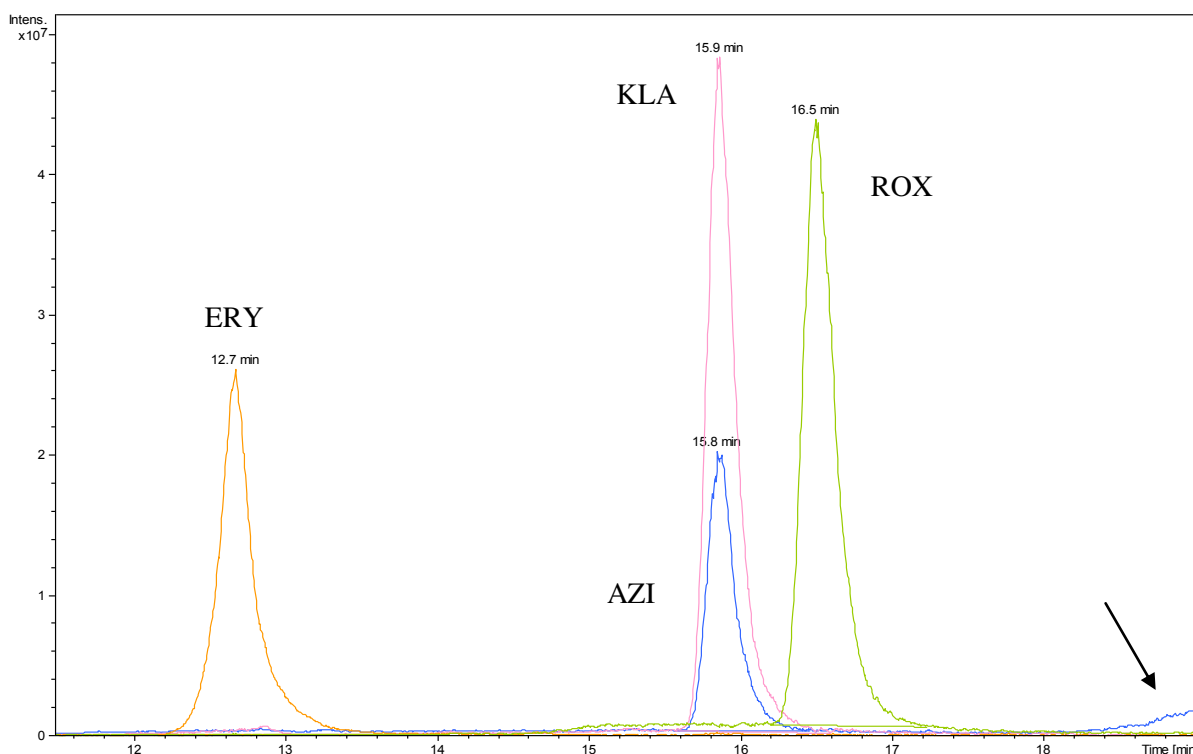
Tato kolona pracuje rovněž v módu obrácených fází. Stacionární fáze je složena ze silikagelu modifikovaného oktadecylem, částice mají pevné jádro. Kolona je stabilní v rozmezí pH 1,5 až 8,5, je možná používat do tlaku 600 bar, teplotně je stabilní do 60 °C [102]. Velké množství studií zabývajících se stanovením makrolidových antibiotik právě tento druh stacionárních fází používalo, a proto byla tato kolona vybrána k experimentálnímu ověření. Byly nastaveny následující podmínky:

**HPLC podmínky:**

<b>MF</b>	A: 10 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> pH=6,7
	B: acetonitril
<b>průtok</b>	0,20 ml/min
<b>nástřik</b>	2,5 µl
<b>gradient</b>	od 25 % ACN po 90 % ACN v 9. minutě
<b>teplota kolony</b>	40 °C
<b>délka analýzy</b>	18 min + 12 min ekvilibrace kolony

**MS podmínky:**

<b>tlak zmlžovače</b>	25 psi
<b>průtok sušícího plynu</b>	10 l/min
<b>teplota sušícího plynu</b>	350 °C
<b>ionizační mód</b>	pozitivní
<b>scan</b>	100-900 m/z



Obrázek č. 29: Extrahované iontové chromatogramy pro jednotlivé makrolidy, koncentrace 1000 ng/ml

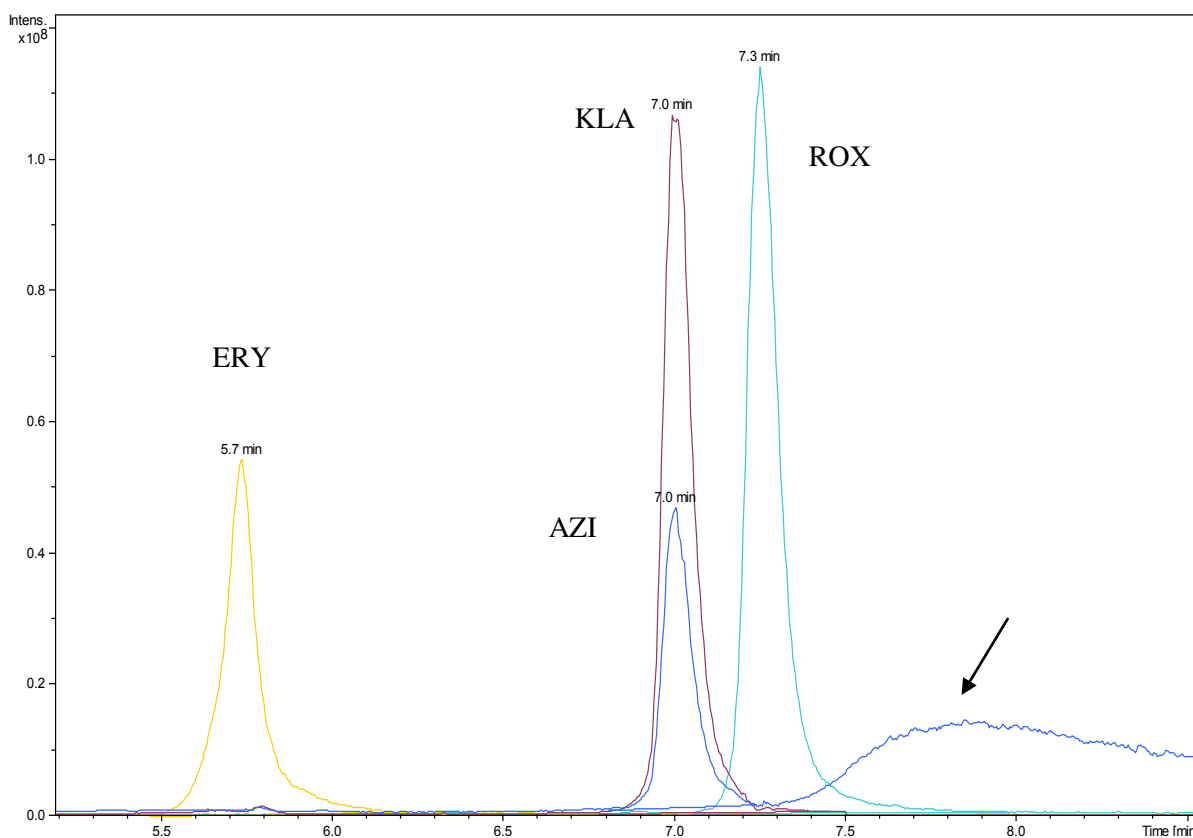
Jak je vidět z obrázku č. 29, při těchto chromatografických podmínkách byly píky analytů široké a jejich tvar, zejména u erythromycinu, nebyl ideální. U azithromycinu a klarithromycinu docházelo ke koeluci, nicméně pro MS detekci tato skutečnost problém nepředstavuje. Největším problémem bylo neideální chování azithromycinu na této koloně, po eluci v čase 15,8 min byl totiž v určité době pozorován další nárůst jeho intenzity signálu (viz. šipka v obrázku č. 29).

K dosažení vyšší účinnosti kolony byl dále zvýšen průtok mobilní fáze. Optimum průtoku pro tuto kolonu se pohybuje okolo 0,50 ml/min. Pro možnost pracovat s těmito vyššími průtoky byl na elektrosprej nainstalován spacer, který zvětšuje prostor mezi ústím sprejovací jehly a přestupní kapilárou. Toto zvýšení průtoku znamenalo i nárůst zpětného tlaku, proto byla teplota kolony upravena na 40 °C.

HPLC podmínky	
MF	A: 10 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> pH=6,7
	B: acetonitril
průtok	0,50 ml/min
nástrík	2,5 µl
gradient	od 25 % ACN po 90 % ACN v 4. minutě
teplota kolony	40 °C
délka analýzy	9 min + 6 min ekvilibrace kolony

### MS podmínky

tlak zmlžovače	35 psi
průtok sušícího plynu	12 l/min
teplota sušícího plynu	350 °C
ionizační mód	pozitivní
scan	500-1000 m/z



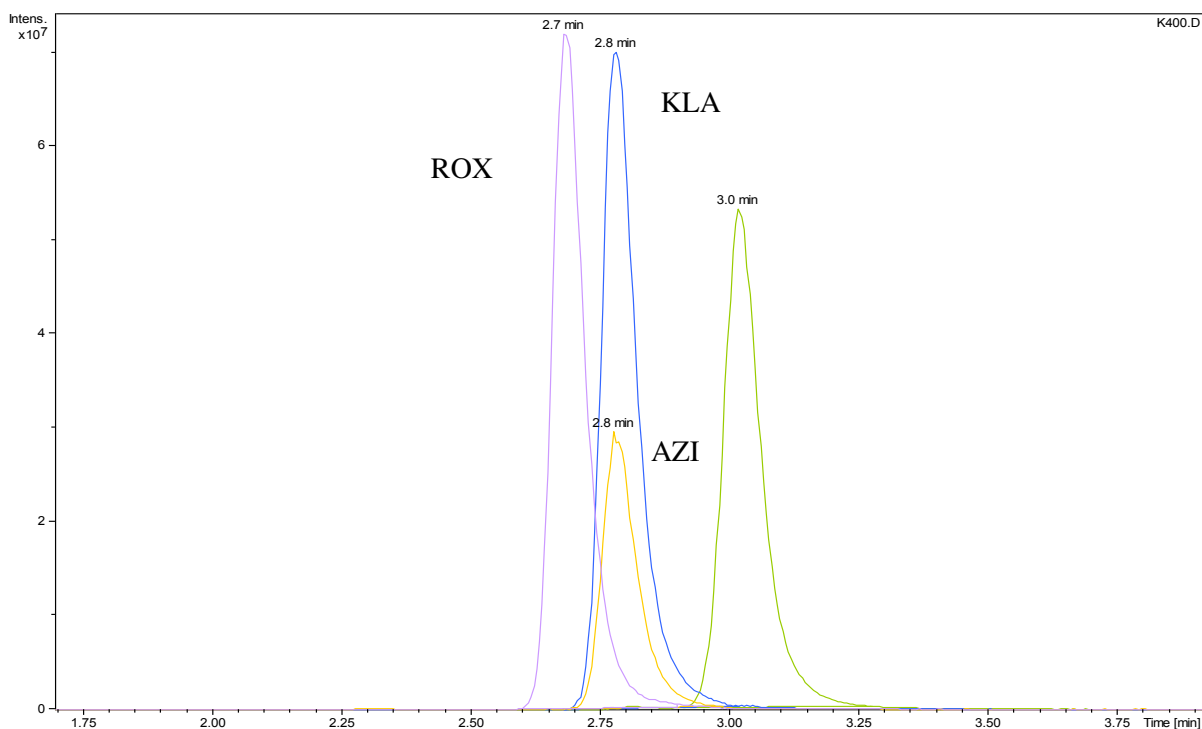
Obrázek č. 30: Extrahovaný iontový chromatogram pro jednotlivé makrolidy, koncentrace 1000 ng/ml

Z chromatogramu je patrné značné snížení retenčních časů analytů, zvyšuje se účinnost kolony, vzrůstá intenzita signálu. Nicméně na neideálním chování azithromycinu se nic nezměnilo, také u píku erythromycinu nedochází ke zlepšení. Ani další prováděné změny v gradientu neměly za následek zlepšení tvaru píků.

#### 4.2.1.3. Kolona Ascentis Express HILIC, 150 × 2,1 mm, 2,7 μm

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem bylo ověřováno použití i další kolony. Tato kolona pracuje na principu normálních fází; stacionární fází je nevázaný silikagel, který je stabilní v rozmezí pH 1 až 8. Mechanismus retence je více komplexní a zahrnuje např. dělení kapalina-kapalina (na povrchu silikagelu je držena vrstva vody z mobilní fáze, především při jejím vyšším procentu) a/nebo se uplatňuje mechanismus adsorpce polárních funkčních skupin analytů na stacionární fází. Vhodná je na separaci polárních látek [103]. Na této koloně byly vyzkoušeny následující podmínky.

<b>HPLC podmínky:</b>	
<b>MF</b>	A: 10 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> pH=6,7
	B: acetonitril
<b>průtok</b>	0,60 ml/min
<b>nástrík</b>	2,5 µl
<b>eluce</b>	izokratická, 80 % acetonitrilu
<b>teplota kolony</b>	50 °C
<b>délka analýzy</b>	4 min + 4 min ekvilibrace kolony
<b>MS podmínky:</b>	
<b>tlak zmlžovače</b>	35 psi
<b>průtok sušícího plynu</b>	12 l/min
<b>teplota sušícího plynu</b>	350 °C
<b>ionizační mód</b>	pozitivní
<b>scan</b>	100-900 m/z



Obrázek č. 31: Extrahovaný iontový chromatogram pro jednotlivé makrolidy, koncentrace 400 ng/ml

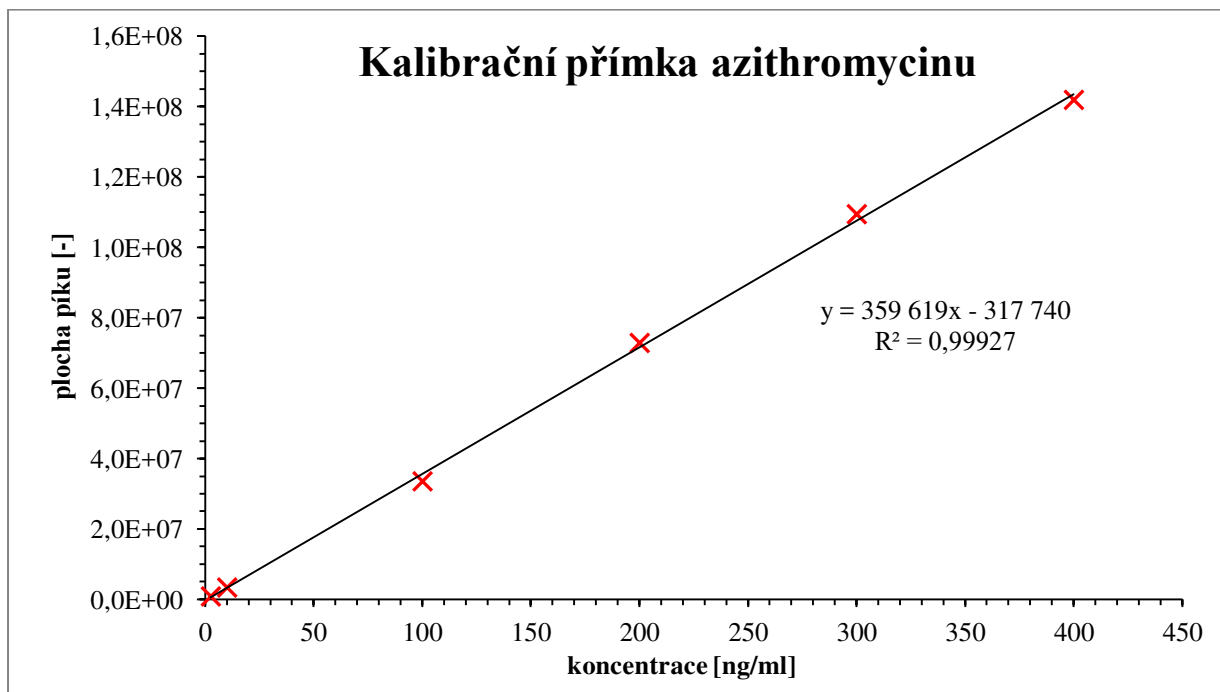
Použití této kolony představuje vhodný výběr, protože s touto kolonou byly již nalezeny optimální podmínky pro analýzu sledovaných antibiotik. Došlo k dalšímu poklesu v čase analýzy, tvary píků byly již optimální, jejich šířka se také snížila a intenzita signálu značně vzrostla. Rovněž byly vyzkoušeny různé typy gradientů, avšak izokratická separace s 80 % acetonitrilu byla ideální. Pro analýzu reálných vzorků bylo však nutné, a to po eluci erythromycinu ve 3. minutě, zvýšit eluční sílu mobilní fáze tak, aby byly z kolony vyeluovány i látky s vyšší retencí. Rozsah skenování iontové pasti byl upraven následovně: ze 100–900 m/z na 500–1000 m/z.



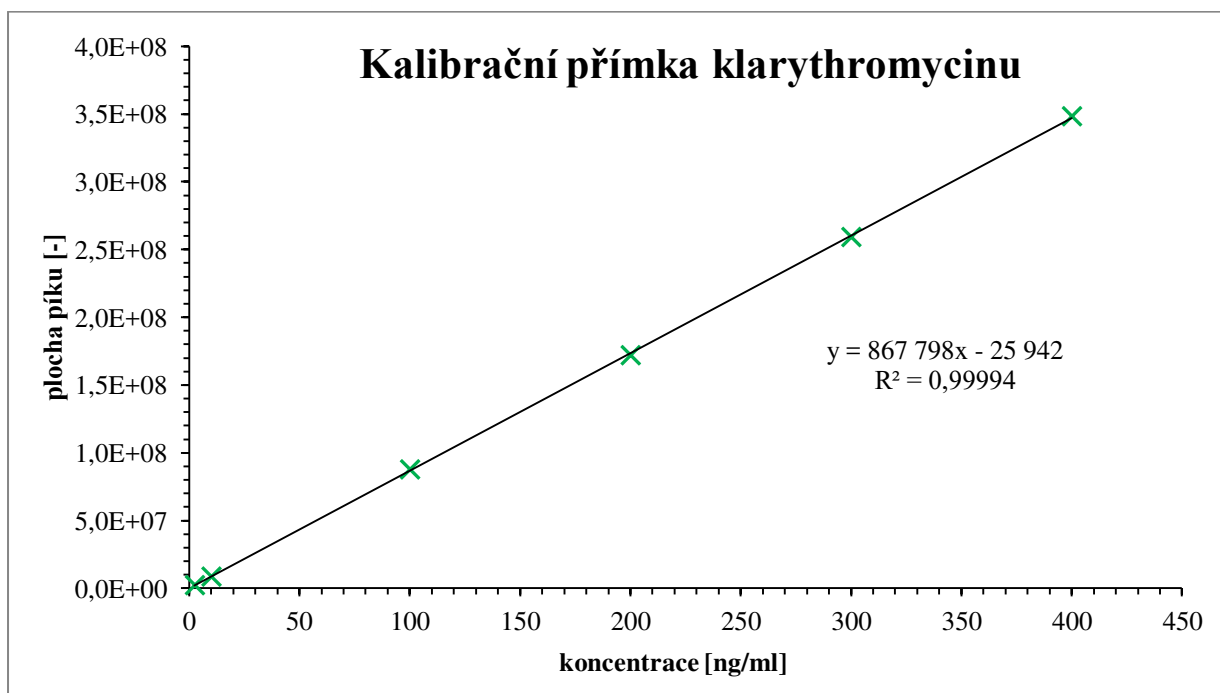
### 4.3. Optimalizace SPE extrakce

#### 4.3.1. Kalibrační přímka

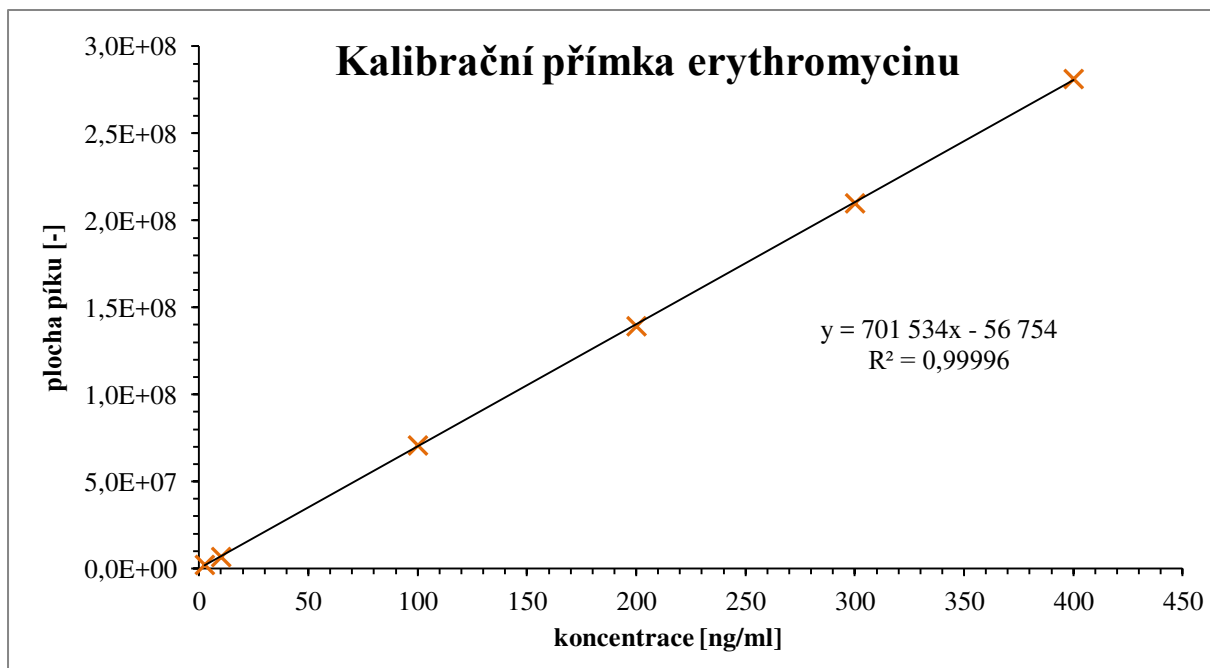
Pro zjištění koncentrací, a tím i výtěžnosti SPE metody, byly sestrojeny kalibrační přímky představující závislosti plochy píků na koncentraci. Rozsah kalibrace byl proveden v rozsahu na 2,5–400 ng/ml.



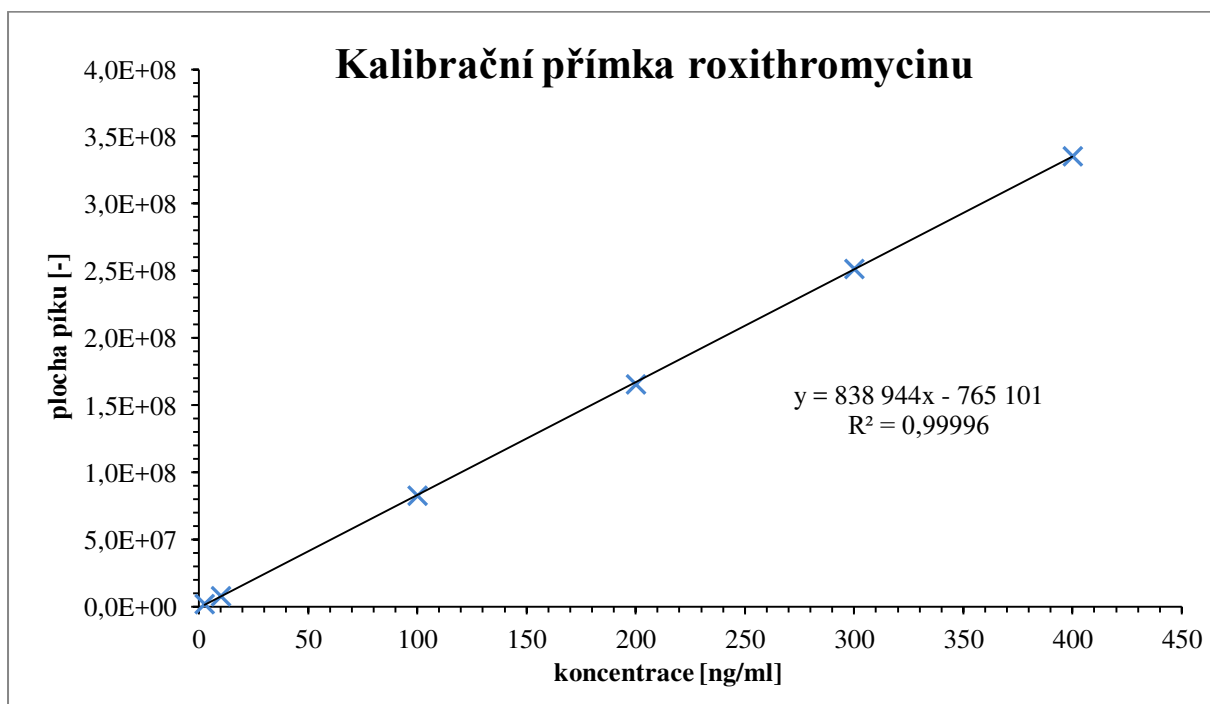
Graf č. 3: Kalibrační přímka azithromycinu



Graf č. 4: Kalibrační přímka klarithromycinu



Graf č. 5: Kalibrační přímka erythromycinu



Graf č. 6: Kalibrační přímka roxithromycinu

#### 4.3.2. Výběr vhodného druhu kolonky a pracovního postupu

Byly ověřovány celkem tři typy SPE kolonek, a to Supel Select HLB 200 mg/6 ml, Supelclean ENVI-18 SPE 500 mg/6 ml a Oasis PRiME 60 mg/3 ml.

Na těchto kolonkách byl ověřován pracovní postup č. 1. Objemy a druhy kondicionálních, promývacích a elučních činidel byly vybrány na základě doporučení výrobce kolonek a na základě vlastností sledovaných analytů. Pro každý druh kolonky byly provedeny dvě paralelní stanovení a výsledné hodnoty byly zprůměrovány.

**Postup č. 1:**

<b>kondicionace</b>	5 ml acetonitrilu
	5 ml 10 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> o pH 7
<b>nanesení vzorku</b>	200 ml vody o pH 7, obsah 300 ng každého antibiotika
<b>promytí</b>	3 ml milli-Q vody o pH 7
<b>sušení</b>	vzduchem 15 minut
<b>eluce</b>	2 × 2 ml acetonitrilu
<b>odpaření</b>	pod dusíkem podporované zahříváním na 40 °C
<b>rozpuštění</b>	1 ml acetonitrilu

Na kolonkách Oasis PRiME bylo dosaženo účinnosti v rozmezí 7–10 % a na kolonkách Supelclean ENVI-18 nebyly analyty zadržovány. Nejlepší výsledky byly dosaženy při použití kolonek Supel Select HLB, jejichž účinnost se pohybovala v rozmezí 86–90 %. Tyto kolonky byly proto vybrány jako optimální pro extrakci daných antibiotik.

Tabulka č. 10: Stanovené koncentrace analytů a účinnosti pro jednotlivé druhy kolonek

	<b>AZI</b>		<b>KLA</b>		<b>ERY</b>		<b>ROX</b>	
	c [ng/ml]	η [%]	c [ng/ml]	η [%]	c [ng/ml]	η [%]	c [ng/ml]	η [%]
<b>PRiME</b>	30,75	10,25	22,92	7,64	22,65	7,55	23,01	7,67
<b>ENVI</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>HLB</b>	266,0	88,66	260,9	86,98	258,8	86,27	270, 6	90,19

### 4.3.3. Modifikace postupu pro kolonky Supel Select HLB 200 mg/6 ml

#### 4.3.3.1. Vliv použitého kondicionačního činidla

Důvodem tohoto ověřování byla snaha o zjednodušení kondicionačního kroku; místo použití roztoku octanového pufru o určité koncentraci a pH byla vyzkoušena pouze milli-Q voda o pH 7 při zachování stejných parametrů jako u postupu č. 1. Efekt této modifikace měl však negativní vliv (pokles o 5 %) na účinnost extrakce, a proto byl jako optimální ponechán roztok 10 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> o pH 7. Vzhledem k vysoké účinnosti extrakce při výchozím postupu nebylo dále třeba modifikovat druh organické části kondicionace.

#### 4.3.3.2. Vliv objemu nanášeného vzorku

Na extrakci může mít vliv i celkový objem nanášeného vzorku; tato skutečnost ověřována nebyla, protože při vyšším objemu jak 200 ml by už hrozilo u reálných vzorků ucpávání kolonky (i když byla voda filtrována). Nižší objem vody by pak znamenal menší absolutní množství přítomných analytů (nižší koncentrace v konečném extraktu) a tím i nižší intenzitu signálu.

#### 4.3.3.3. Vliv koncentrace analytů

Dále byla účinnost ověřena rovněž na nižší koncentrační hladině, a to při obsahu 15 ng ve 200 ml. Tyto hodnoty byly vybrány na základě předpokládaných koncentrací v odpadní vodě (75 ng/ml a 1500 ng/l). Pro každou koncentrační úroveň bylo provedeno šest paralelních stanovení a výsledky byly statisticky zpracovány. Bylo zjištěno, že v tomto koncentračním rozmezí jsou účinnosti extrakce srovnatelné.

#### 4.3.3.4. Vliv promývacího činidla

Promývací krok je důležitý k získání čistšího extraktu, což má pozitivní dopad u samotné analytické koncovky. Chromatografická kolona není tolik zatěžována, snižuje se množství možných interferentů (jiná míra účinku i v závislosti na způsobu detekce, např. MS vs. MS<sup>2</sup> atd.). Jako promývací činidlo byla testována milli-Q voda o pH 7 a roztok 5% methanolu v milli-Q vodě o pH 7 a objemu 3 ml. Použití roztoku methanolu již mělo znatelný negativní vliv na účinnost, analyty byly pravděpodobně částečně eluovány již v promývacím kroku, účinnosti se pohybovaly pro všechny analyty okolo 70 %.

#### 4.3.3.5. Vliv množství sorbentu

Dostupné byly i kolonky stejné značky, avšak stacionární fáze měla hmotnost 60 mg. Kolonky byly otestovány za použití optimalizovaného postupu č. 1. Bylo zjištěno, že nižší množství sorbentu není pro izolaci analytů dostatečné. Účinnosti se pohybovaly pro všechny analyty okolo 20 %.

#### 4.3.3.6. Další parametry mající vliv na účinnost extrakce makrolidů

Dalším možným parametrem ovlivňujícím extrakci je pro polární analyty hodnota pH, pro makrolidy s hodnotami pK<sub>a</sub> blízcími se 9 nelze očekávat, že by nižší než použité pH bylo účinnější. Hodnota pH 7, která poskytovala vysoké účinnosti, byla proto zvolena za optimální. Dále i použité eluční činidlo a jeho objem může výrazně ovlivnit výtěžnost. Jelikož účinnost extrakce při výchozím postupu byla dostatečně vysoká, nebylo třeba tento krok ještě optimalizovat.

#### 4.3.4. Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení optimalizované metody bylo za identických podmínek provedeno šest paralelních stanovení pro dvě koncentrační úrovně.

Tabulka č. 11: Výsledné koncentrace analytů pro kolonky Supel Select HLB 200 mg/6 ml, postup č. 1, teoretická koncentrace v extraktu 300 ng/ml

Teoretická koncentrace [ng/ml]	Výsledná koncentrace [ng/ml]			
	AZI	KLA	ERY	ROX
300	268,3	266,4	260,2	270,4
300	263,7	255,4	257,4	270,7
300	276,7	278,7	256,2	284,7
300	273,0	274,7	260,1	265,8
300	277,4	267,2	263,4	275,8
300	263,3	270,0	254,1	266,9

Tabulka č. 12: Výsledné koncentrace analytů pro kolonky Supel Select HLB 200 mg/6 ml, postup č. 1, teoretická koncentrace v extraktu 15 ng/ml

Teoretická koncentrace [ng/ml]	Výsledná koncentrace [ng/ml]			
	AZI	KLA	ERY	ROX
15	12,74	11,83	13,17	13,52
15	13,99	13,59	12,14	14,50
15	13,22	12,85	12,63	13,36
15	12,97	13,70	13,10	13,73
15	12,85	12,98	13,25	13,95
15	13,55	13,23	12,89	14,23

Tabulka č. 13: Porovnání účinností extrakce pro obě koncentrační úrovně

	Účinnost [%]							
	AZI		KLA		ERY		ROX	
	15 ng/ml	300 ng/ml	15 ng/ml	300 ng/ml	15 ng/ml	300 ng/ml	15 ng/ml	300 ng/ml
1	84,92	89,43	78,84	88,81	87,80	86,74	90,14	90,13
2	93,29	87,89	90,60	85,15	80,93	85,79	96,64	90,24
3	88,13	92,22	85,66	92,89	84,21	85,40	89,05	94,88
4	86,45	91,01	91,35	91,58	87,33	86,71	91,51	88,61
5	85,70	92,47	86,56	89,05	88,33	87,78	92,99	91,94
6	90,32	87,77	88,23	90,01	85,93	84,69	94,90	88,95
<b>průměr</b>	<b>88,14</b>	<b>90,13</b>	<b>86,87</b>	<b>89,58</b>	<b>85,76</b>	<b>86,19</b>	<b>92,54</b>	<b>90,79</b>

Pro obě koncentrační úrovně byla následně vypočtena směrodatná odchylka S v MS Excel funkcí SMODCH. Relativní směrodatná odchylka RSD byla vypočtena podle vzorce:

$$RSD = \frac{100 \cdot S}{\bar{c}}$$

S ... směrodatná odchylka [ng/ml]

$\bar{c}$  ... průměrná koncentrace [ng/ml]

Pomocí funkce VAR. VÝBĚR byl následně vypočten rozptyl naměřených hodnot.

Tabulka č. 14: Účinnosti a základní statistické parametry SPE pro spike 300 ng/ml

	AZI	KLA	ERY	ROX
<b>průměrná koncentrace [ng/ml]</b>	270,4	268,7	258,6	272,4
<b>průměrná účinnost [%]</b>	90,13	89,58	86,18	90,79
<b>směrodatná odchylka [ng/ml]</b>	5,71	7,32	3,03	6,36
<b>RSD [%]</b>	2,11	2,72	1,17	2,33
<b>rozptyl [ng/ml]</b>	39,06	64,24	11,05	48,48

Tabulka č. 15: Účinnosti a základní statistické parametry SPE pro spike 15 ng/ml

	AZI	KLA	ERY	ROX
<b>průměrná koncentrace [ng/ml]</b>	13,22	13,03	12,86	13,88
<b>průměrná výtěžnost [%]</b>	88,13	86,87	85,76	92,54
<b>směrodatná odchylka [ng/ml]</b>	0,43	0,62	0,38	0,39
<b>RSD [%]</b>	3,29	4,74	2,97	2,84
<b>rozptyl [ng/ml]</b>	0,23	0,46	0,18	0,19

#### 4.3.5. Matriční efekt

Látky přítomné ve vodě mohou mít negativní, pozitivní nebo žádný efekt na účinnost SPE. Proto bylo provedeno ověření této teorie. Za optimalizovaného SPE postupu byla analyzována voda z přítoku a odtoku, odebraná na ČOV VFU Brno; do vody bylo nadávkováno 300 ng od každého antibiotika. Současně byla provedena extrakce a stanovení pro vzorek bez přídavku. Plochy píků analytů s přídavkem byly odečteny od ploch píků analytů ve vzorku bez přídavku; nicméně ani tento postup není zcela přesný. V ideálním případě by měl být matriční efekt vyhodnocován na vodě, která je sledovaných analytů prostá, avšak má stejné všechny ostatní vlastnosti jako voda, která má být analyzována na obsah těchto látek. Tyto podmínky jsou jen těžko dosažitelné, protože laboratorně připravená odpadní voda se nemusí zcela shodovat s reálnou odpadní vodou, ve které je přítomno velké množství různých látek. Další možností je stanovení matričního efektu na reálné vodě, u které je vysoká pravděpodobnost, že cílové analyty neobsahuje; zde však může být také problém, protože ne všechny léčivé látky jsou schváleny nebo používány v rámci určitého státu.

Matriční efekt byl vypočítán podle následující rovnice:

$$\%M = 100 \cdot \frac{\text{plocha píku v reálném vzorku}}{\text{plocha píku v modelovém vzorku}} \quad [104]$$

Byl pozorován negativní vliv matrice na extrakci makrolidových antibiotik. Nejsilnější vliv byl zjištěn na přítoku do ČOV. Pro azithromycin a klarithromycin byl pozorován největší pokles. Hodnoty matričních efektů pro jednotlivá antibiotika jsou shrnuty do následující tabulky.

Tabulka č. 16: Stanovené hodnoty matričních efektů

	M [%]			
	AZI	KLA	ERY	ROX
<b>přítok</b>	46,14	47,53	55,35	62,44
<b>odtok</b>	92,15	91,25	95,87	98,75

#### 4.4. Reálné vzorky

Optimalizovaná LC/MS a SPE metoda byla následně použita k analýze reálných vzorků odpadních/vyčištěných vod z ČOV.

Rovněž byly vypočteny meze detekce a meze stanovitelnosti podle následujících vztahů.

Mez detekce (LOD) dle vztahu:

$$\text{LOD} = 3 \cdot \frac{c}{S/N} \quad [105]$$

c ... koncentrace analytu

S ... signál, výška píku při koncentraci c

N ... výška šumu

Mez stanovitelnosti (LOQ) dle vztahu:

$$\text{LOQ} = 10 \cdot \frac{c}{S/N} \quad [105]$$

c ... koncentrace analytu

S ... signál, výška píku při koncentraci c

N ... výška šumu

Výška šumu byla odečtena z deseti míst v okolí píku analytu (z jeho příslušného EIC) a byla zprůměrována, bylo pracováno s nejnižším bodem kalibrace, tj. 2,5 ng/ml.

Tímto způsobem byly zjištěny limity detekce a kvantifikace při optimalizovaných podmínkách.

Vybrané makrolidy byly na ČOV VFU Brno detekovány, jejich přítomnost byla potvrzena na přítoku i na odtoku s výjimkou roxithromycinu. Nejvyšší koncentrace byly prokázány u azithromycinu a klarithromycinu. Účinnost čistícího procesu byla pro všechny antibiotika vyšší jak 50 %.

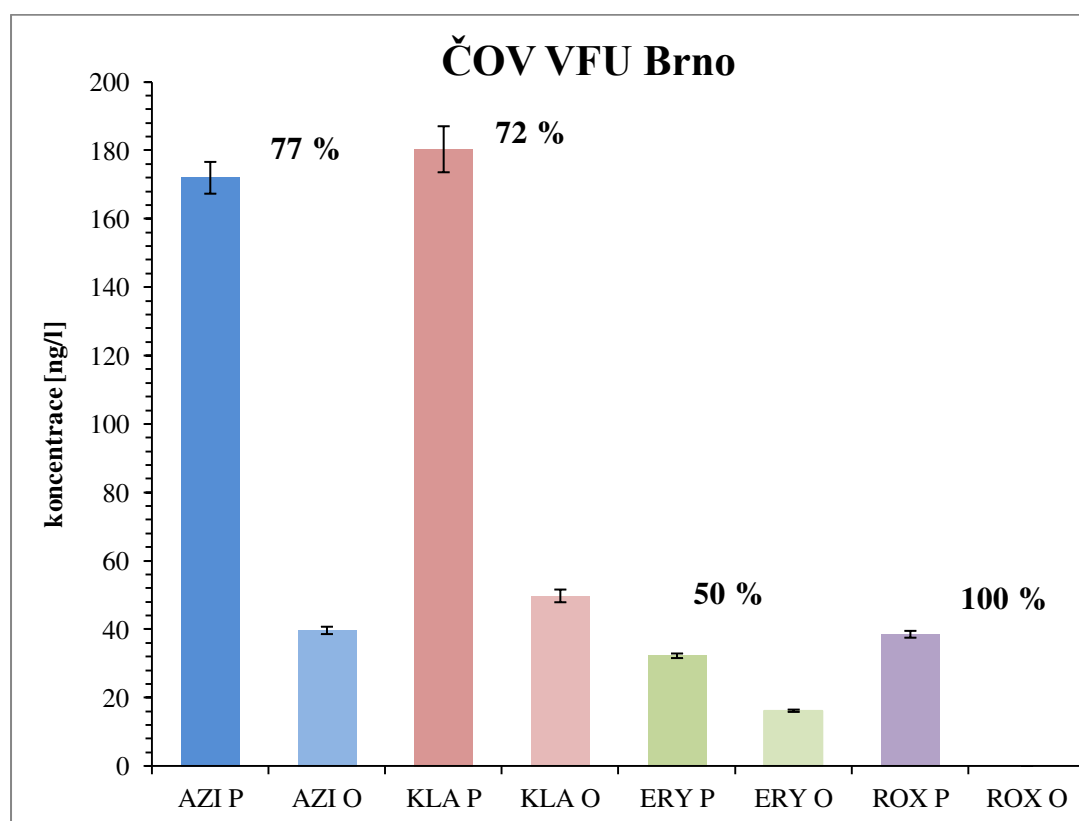
Tabulka č. 17: Metrologické parametry sledovaných analytů

	<b>LOD [ng/ml]</b>	<b>LOQ [ng/ml]</b>	<b>Rovnice regrese</b>	<b>Koeficient determinace R<sup>2</sup></b>
<b>AZI</b>	0,6567	2,189	$y = 359\,619x - 317\,740$	0,99927
<b>KLA</b>	0,3587	1,196	$y = 867\,798x - 25\,942$	0,99994
<b>ERY</b>	0,5908	1,969	$y = 701\,534x - 56\,754$	0,99996
<b>ROX</b>	0,3916	1,305	$y = 838\,944x - 765\,101$	0,99996

#### 4.4.1. ČOV VFU Brno

Tabulka č. 18: Koncentrace makrolidů na ČOV VFU Brno a účinnost jejich odstranění

	koncentrace [ng/l]			
	AZI	KLA	ERY	ROX
<b>P 7.4.</b>	172,0 ± 4,644	180,3 ± 6,727	32,27 ± 0,6681	38,55 ± 0,9985
<b>O 7.4.</b>	39,69 ± 1,072	49,78 ± 1,857	16,202 ± 0,3354	ND
<b>účinnost</b>	<b>77 %</b>	<b>72 %</b>	<b>50 %</b>	<b>~100 %</b>



Graf č. 7: Stanovené koncentrace antibiotik na přítoku a odtoku ČOV VFU Brno 7. 4. 2016 s procentuelním vyjádřením účinnosti čistícího procesu

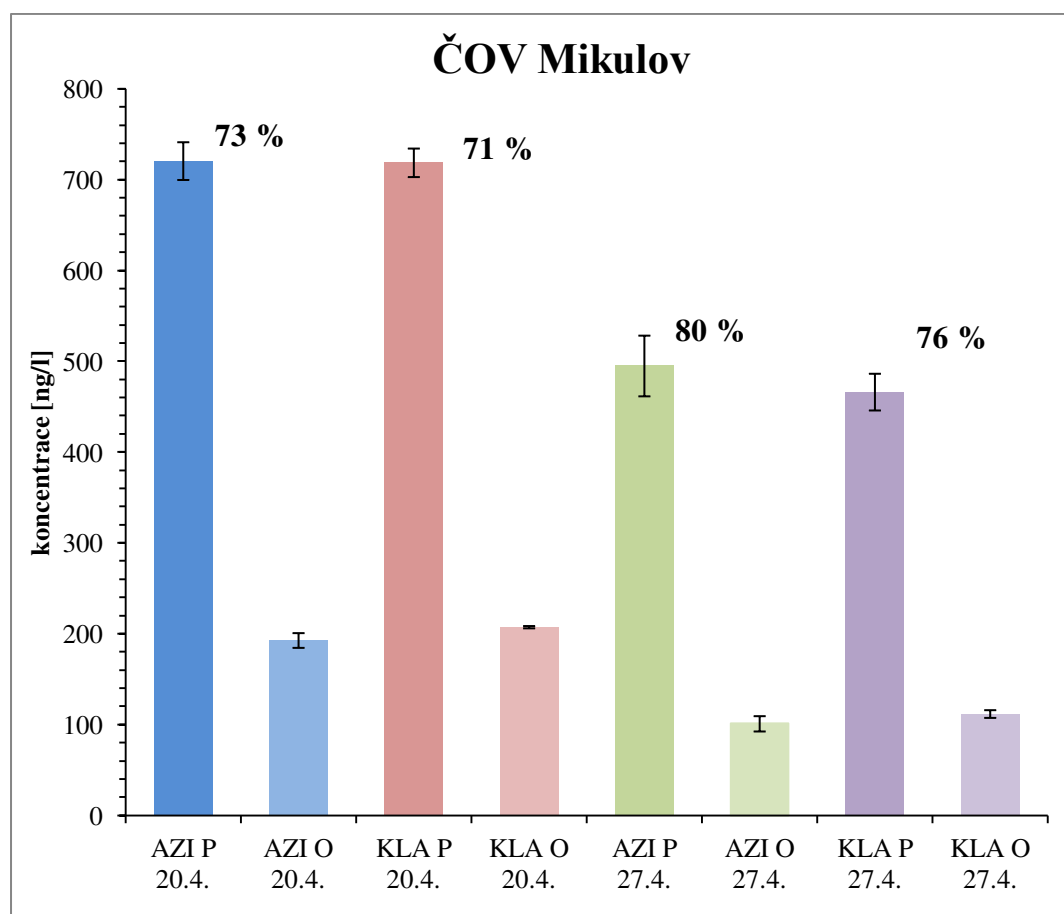
Všechny sledované analyty byly detekovány a kvantifikovány v odpadní vodě z přítoku na ČOV, rovněž s výjimkou roxithromycinu byly analyty detekovány i na odtoku z ČOV. Účinnost čistícího procesu se pohybovala v rozpětí 50–100%.



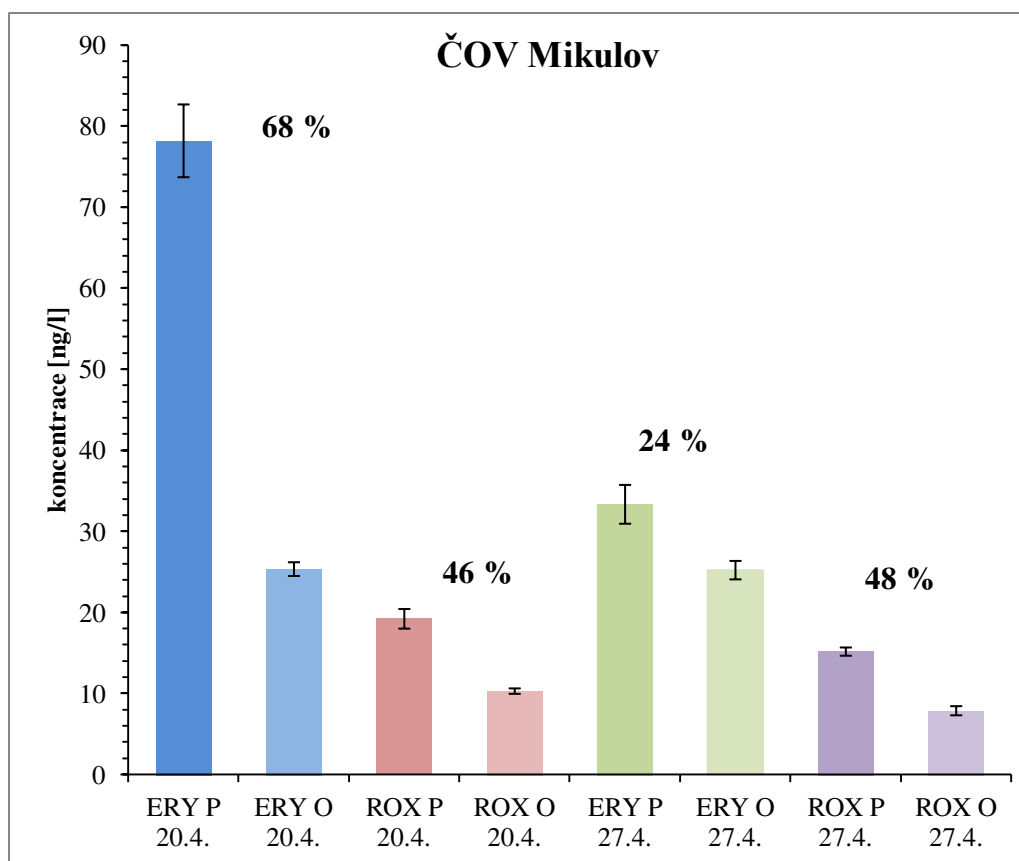
#### 4.4.2. ČOV Mikulov

Tabulka č. 19: Koncentrace makrolidů na ČOV Mikulov a účinnost jejich odstranění

	koncentrace [ng/l]			
	AZI	KLA	ERY	ROX
<b>P 20.4.</b>	720,6 ± 20,78	714,8 ± 33,40	78,19 ± 4,491	19,22 ± 1,210
<b>O 20.4.</b>	192,8 ± 8,12	207,5 ± 8,42	25,35 ± 2,396	10,30 ± 0,336
<b>účinnost</b>	<b>73 %</b>	<b>71 %</b>	<b>68 %</b>	<b>46 %</b>
<b>P 27.4.</b>	495,1 ± 15,70	466,3 ± 20,21	33,34 ± 2,396	15,17 ± 0,508
<b>O 27.4.</b>	101,1 ± 1,28	111,8 ± 4,27	25,22 ± 1,140	7,878 ± 0,5618
<b>účinnost</b>	<b>80 %</b>	<b>76 %</b>	<b>24 %</b>	<b>48 %</b>



Graf č. 8: Stanovené koncentrace azithromycinu a klarithromycinu na přítoku a odtoku ČOV Mikulov ve dnech 20. 4. a 27. 4. s procentuelním vyjádřením účinnosti čistícího procesu



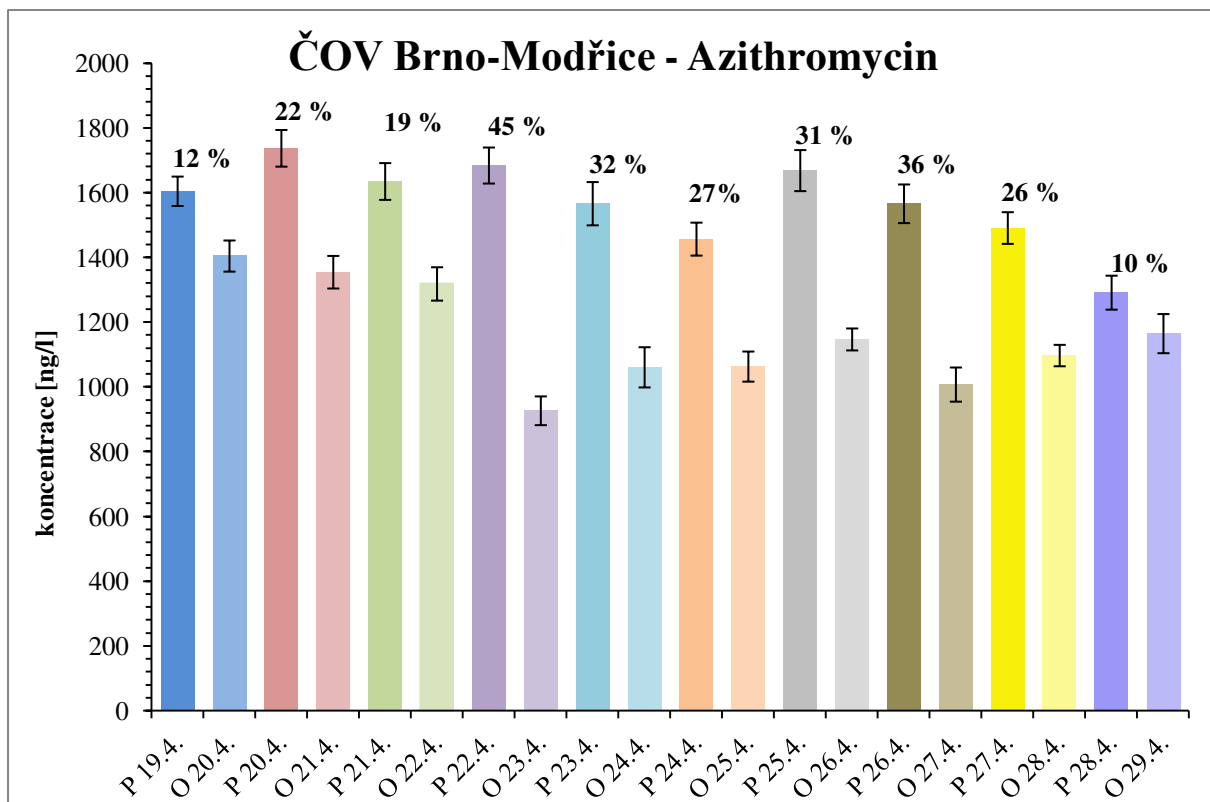
Graf č. 9: Stanovené koncentrace erythromycinu a roxithromycinu na přítoku a odtoku ČOV Mikulov ve dnech 20. 4. a 27. 4. s procentuelním vyjádřením účinnosti čistícího procesu

Jak je zřejmé z příložených grafů a tabulek, sledované analyty byly detekovány a kvantifikovány ve 100 % případů. Nejvyšší koncentrace byly prokázány u azithromycinu a klarithromycinu, nižší potom u erythromycinu a roxithromycinu. Účinnost čistícího procesu se s výjimkou roxithromycinu pohybovala nad 50 %.

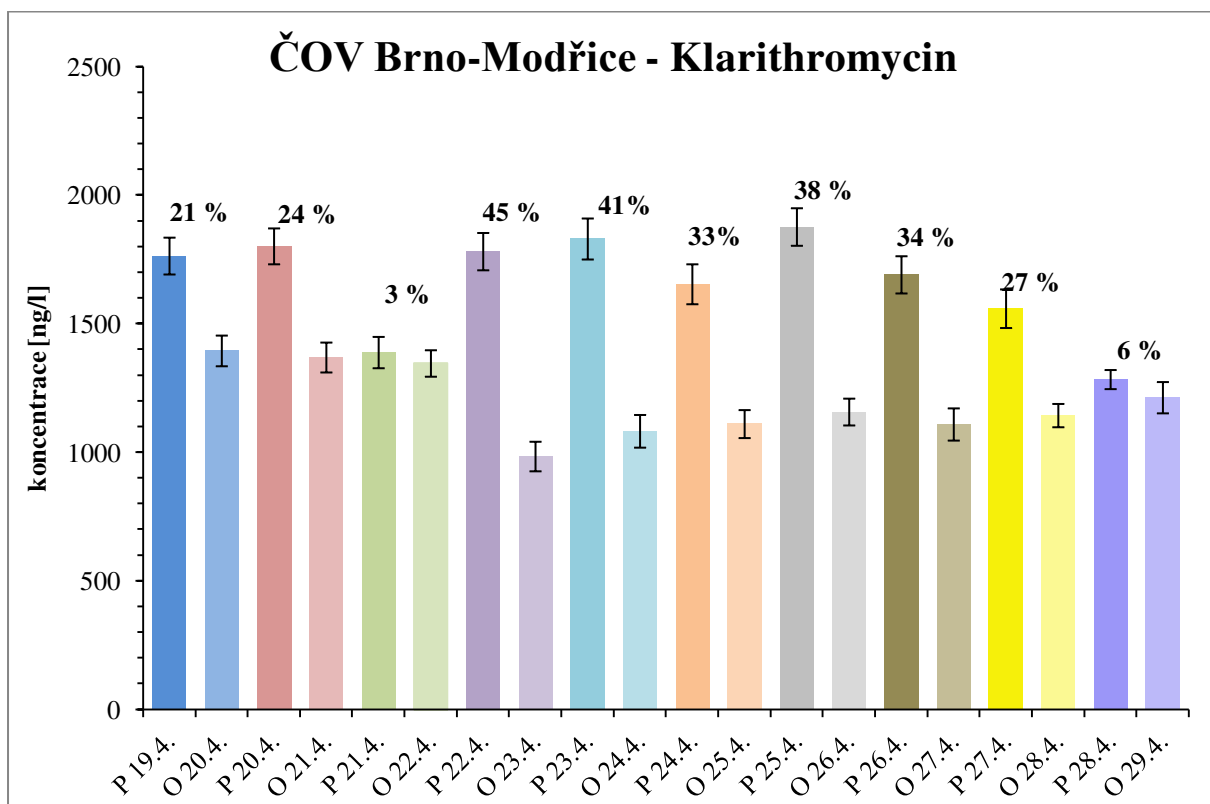
#### 4.4.3. ČOV Brno-Modřice

Tabulka č. 20: Stanovené koncentrace makrolidů na ČOV Brno-Modřice v průběhu 19. – 29. 4. 2016 a procentuelní účinnosti jejich odstranění

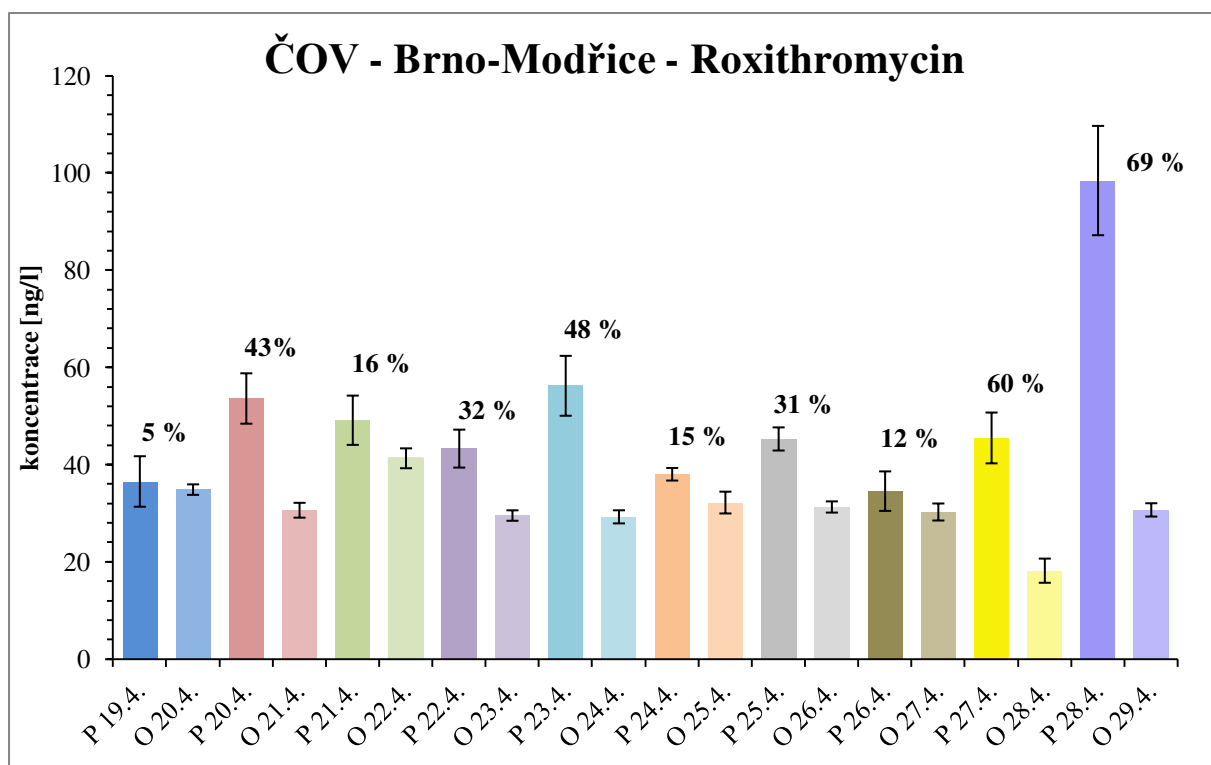
	koncentrace [ng/l]			
	AZI	KLA	ERY	ROX
<b>P 19.4.</b>	1604,4 ± 45,43	1763,1 ± 71,66	71,40 ± 1,778	36,55 ± 5,192
<b>O 20.4.</b>	1404,4 ± 48,08	1394,2 ± 59,66	68,93 ± 1,849	34,88 ± 1,079
<b>účinnost</b>	<b>12 %</b>	<b>21 %</b>	<b>3 %</b>	<b>5 %</b>
<b>P 20.4.</b>	1737,2 ± 56,61	1800,8 ± 69,74	68,26 ± 1,603	53,62 ± 5,184
<b>O 21.4.</b>	1354,5 ± 50,32	1368,5 ± 58,17	64,62 ± 1,701	30,65 ± 1,524
<b>účinnost</b>	<b>22 %</b>	<b>24 %</b>	<b>5 %</b>	<b>43 %</b>
<b>P 21.4.</b>	1634,7 ± 56,82	1378,7 ± 60,87	83,51 ± 7,679	49,15 ± 5,067
<b>O 22.4.</b>	1318,3 ± 51,52	1345,4 ± 51,45	78,54 ± 1,900	41,32 ± 2,044
<b>účinnost</b>	<b>19 %</b>	<b>3 %</b>	<b>6 %</b>	<b>16 %</b>
<b>P 22.4.</b>	1684,0 ± 55,62	1757,5 ± 72,55	67,44 ± 2,093	43,31 ± 3,900
<b>O 23.4.</b>	926,52 ± 44,40	935,29 ± 57,49	61,05 ± 2,078	29,54 ± 1,074
<b>účinnost</b>	<b>45 %</b>	<b>45 %</b>	<b>9 %</b>	<b>32 %</b>
<b>P 23.4.</b>	1566,1 ± 66,82	1843,1 ± 79,70	93,13 ± 7,262	56,23 ± 6,161
<b>O 24.4.</b>	1060,6 ± 62,12	1081,6 ± 63,53	73,72 ± 4,418	29,27 ± 1,347
<b>účinnost</b>	<b>32 %</b>	<b>41 %</b>	<b>21 %</b>	<b>48 %</b>
<b>P 24.4.</b>	1456,7 ± 50,92	1653,4 ± 77,65	83,98 ± 11,58	38,03 ± 1,291
<b>O 25.4.</b>	1063,0 ± 46,45	1109,7 ± 54,41	73,68 ± 4,393	32,21 ± 2,241
<b>účinnost</b>	<b>27 %</b>	<b>33 %</b>	<b>12 %</b>	<b>15 %</b>
<b>P 25.4.</b>	1668,3 ± 63,40	1848,7 ± 72,99	148,7 ± 7,031	45,30 ± 2,383
<b>O 26.4.</b>	1146,8 ± 33,90	1156,5 ± 52,14	82,55 ± 2,211	31,30 ± 1,154
<b>účinnost</b>	<b>31 %</b>	<b>38 %</b>	<b>44 %</b>	<b>31 %</b>
<b>P 26.4.</b>	1554,80 ± 59,66	1690,1 ± 72,36	71,48 ± 1,699	34,56 ± 4,064
<b>O 27.4.</b>	1007,5 ± 52,72	1108,1 ± 62,57	67,24 ± 1,796	30,27 ± 1,750
<b>účinnost</b>	<b>36 %</b>	<b>34 %</b>	<b>6 %</b>	<b>12 %</b>
<b>P 27.4.</b>	1491,0 ± 48,94	1558,3 ± 75,04	50,88 ± 3,330	45,50 ± 5,225
<b>O 28.4.</b>	1097,1 ± 33,12	1142,7 ± 45,28	45,72 ± 3,210	18,20 ± 2,487
<b>účinnost</b>	<b>26 %</b>	<b>27 %</b>	<b>10 %</b>	<b>60 %</b>
<b>P 28.4.</b>	1291,3 ± 52,45	1282,8 ± 37,15	63,66 ± 2,063	98,46 ± 12,25
<b>O 29.4.</b>	1164,8 ± 60,46	1212,3 ± 60,86	56,50 ± 1,816	30,70 ± 1,369
<b>účinnost</b>	<b>10 %</b>	<b>6 %</b>	<b>11 %</b>	<b>69 %</b>



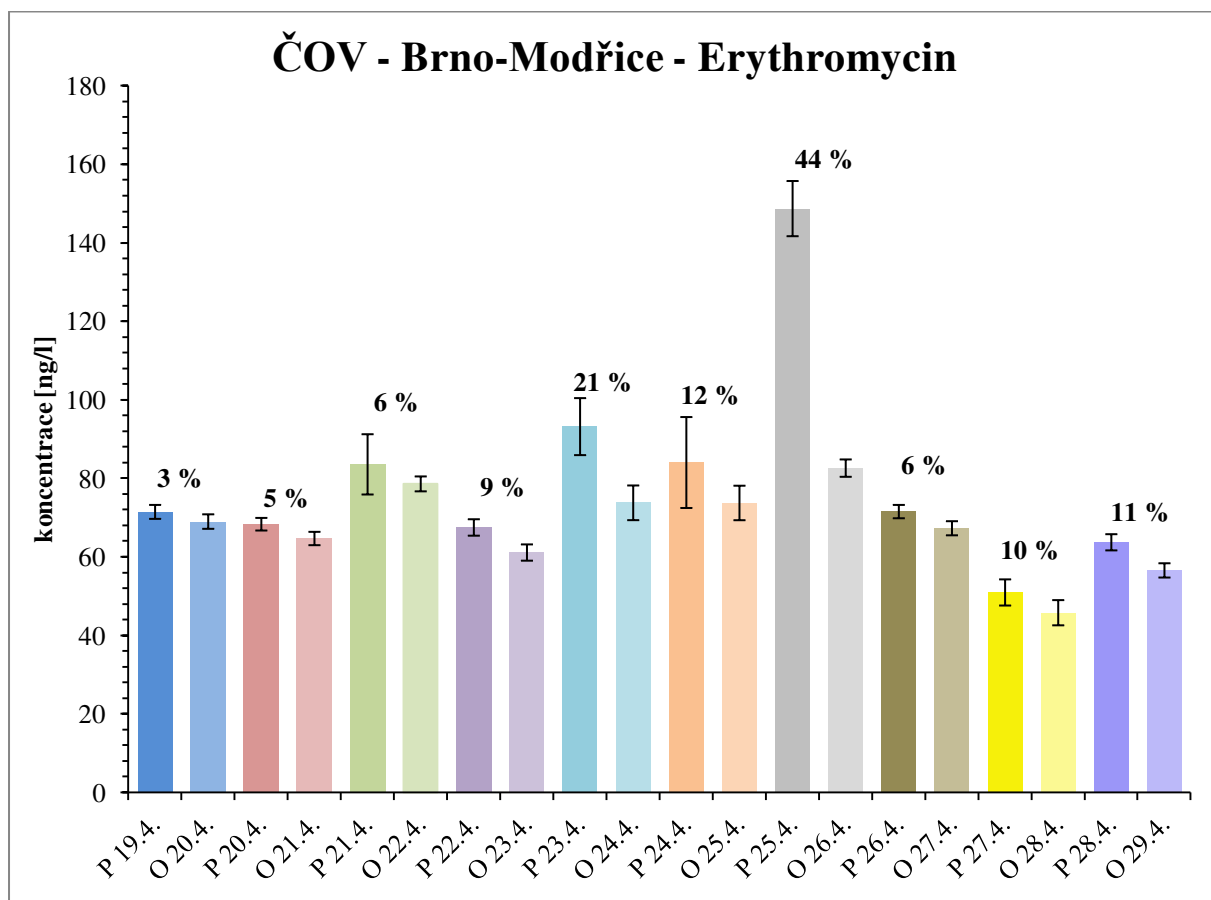
Graf č. 10: Stanovené koncentrace azithromycinu s procentuelním vyjádřením účinnosti čistícího procesu



Graf č. 11: Stanovené koncentrace klarithromycinu s procentuelním vyjádřením účinnosti čistícího procesu



Graf č. 12: Stanovené koncentrace roxithormycinu s procentuelním vyjádřením účinnosti čistícího procesu



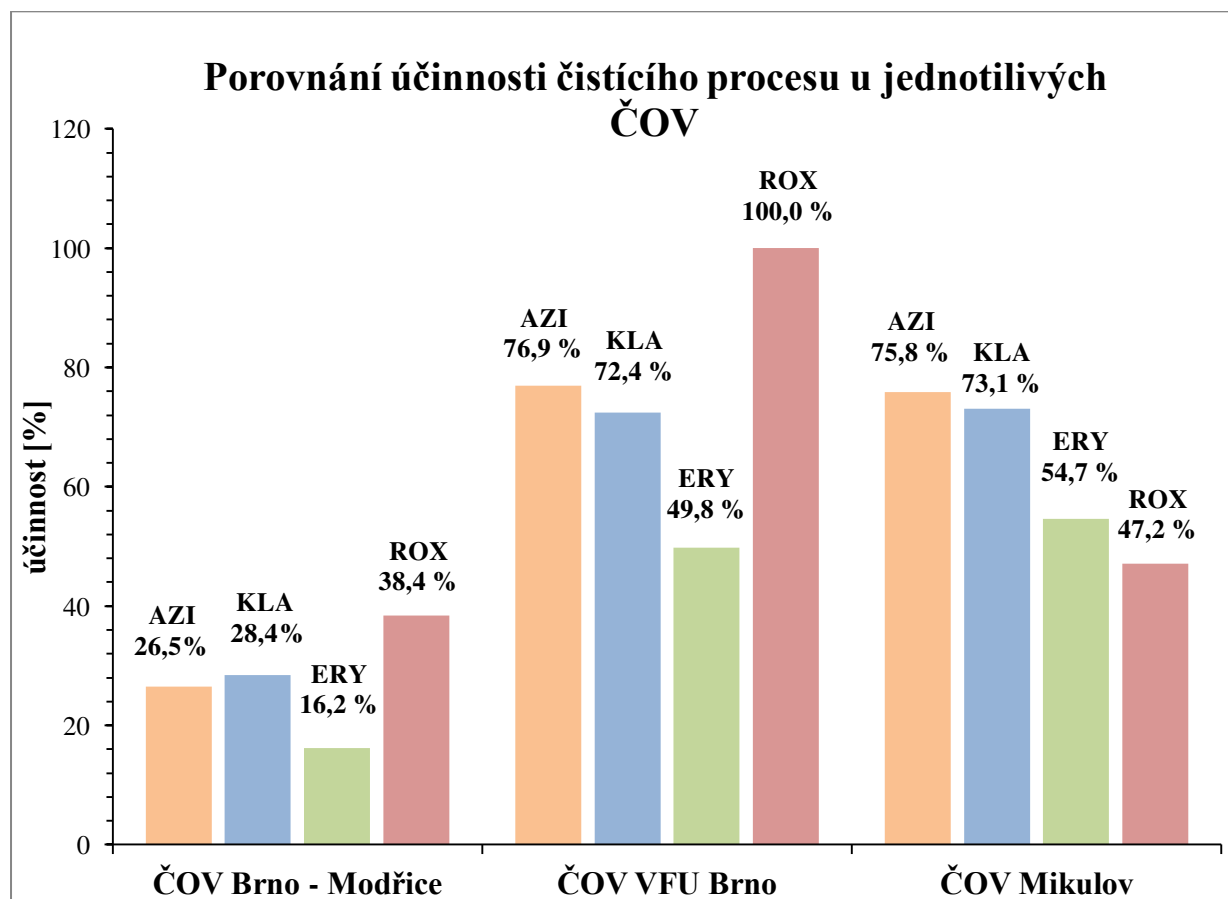
Graf č. 13: Stanovené koncentrace erythromycinu s procentuelním vyjádřením účinnosti čistícího procesu

Tabulka č. 21: Průměrné stanovené hodnoty koncentrace makrolidů na ČOV Brno-Modřice v průběhu 19. –29. 4. 2016 a procentuelní účinnosti jejich odstranění

	koncentrace [ng/l]			
	AZI	KLA	ERY	ROX
<b>Přítok</b>	1570 ± 55,7	1662± 69,0	80,24 ± 4,612	50,07 ± 4,971
<b>Odtok</b>	1154± 48,3	1190± 56,6	67,25 ± 2,537	30,83 ± 1,607
<b>Účinnost</b>	<b>26 %</b>	<b>29 %</b>	<b>16 %</b>	<b>38 %</b>

I na ČOV Brno-Modřice byly sledované analyty detekovány a kvantifikovány. Koncentrace byly nejvyšší pro klarithromycin a azithromycin, u erythromycinu a roxithromycinu byly zjištěny koncentrace o dva řády nižší. Účinnosti čištění se pohybovaly pod 40 %.

#### 4.4.4 Porovnání efektivity čistících procesů u jednotlivých ČOV



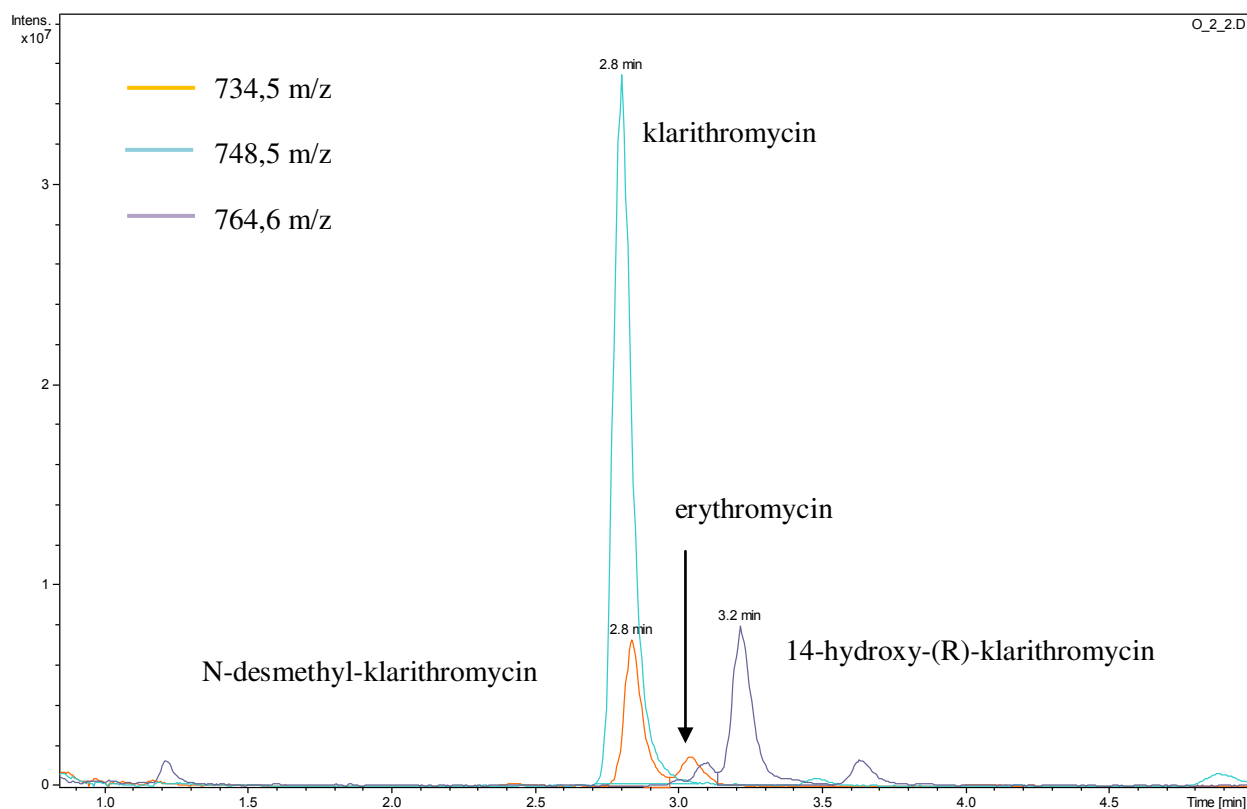
Graf č. 14: Porovnání účinností jednotlivých ČOV

Z naměřených dat je patrné, že nejnižší účinnost odstranění vybraných makrolidů byla zjištěna na ČOV Brno-Modřice. Podstatně vyšší účinnosti v odstraňování všech stanovovaných makrolidů byly prokázány na ČOV situované na Veterinární a farmaceutické univerzitě Brno a na ČOV Mikulov. Nicméně je však důležité upozornit na to, že data získaná z ČOV Brno-Modřice představují průměrné hodnoty za deset dní, u ostatních dvou ČOV se jednalo o odběry prováděné pouze v jednom nebo ve dvou dnech, a proto tyto hodnoty nemusí zcela korektně reflektovat průměrnou situaci. Pro jednoznačné tvrzení, která

ČOV je účinnější, by bylo zapotřebí nastavit stejné podmínky prováděného experimentu. Jak je zřejmé i z příložených grafů, účinnosti odstranění analytů mohou v rámci dnů značně kolísat (např. pro azithromycin rozmezí 10 – 45 %).

#### 4.4.4. Metabolity klarithromycinu

Při vyhodnocování výsledků pro erythromycin s charakteristickou hmotou 734,5 m/z, byl v extrahovaném iontovém chromatogramu přítomný ještě jeden výrazný pík s retenčním časem 2,8 min. Tento pík byl zjištěn ve všech naměřených vzorcích. V literatuře bylo prezentováno, že klarithromycin je v lidském těle metabolizován na dva hlavní produkty, a to 14-hydroxy(R)-klarithromycin a N-desmethyl-klarithromycin (viz. příloha č. 2) o relativní molekulové hmotnosti 763,5, respektive 733,5. Ve studii zabývající se akvatickou toxicitou klarithromycinu a jeho metabolitů byla k jejich detekci použita kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií za ionizace elektrosprejem. Sledovanými hmotami byly 734,5 m/z pro N-desmethyl-klarithromycin a 764,6 m/z pro 14-hydroxy(R)-klarithromycin [54]. Obě tyto hmoty s píky v retenčních časech 2,8 min a 3,2 min byly identifikovány v analyzovaných vzorcích. K ověření hypotézy, že jde opravdu o metabolity klarithromycinu, by mohly sloužit MS<sup>n</sup> experimenty vybraných prekurzorů, při kterých by mohla být objasněna struktura sloučeniny. U N-desmethyl-klarithromycin by se teoreticky dalo očekávat podobné retenční chování jako u klarithromycinu, a to vzhledem k malému rozdílu v chemické struktuře. U 14-hydroxy(R)-klarithromycin by pak retence mohla být vyšší než u klarithromycinu v důsledku přítomnosti další hydroxy- skupiny. Této úvaze odpovídají i naměřená data. K ověření hypotézy a kvantifikaci by nicméně bylo nutné porovnání se standardy.



Obrázek č. 32: EIC pro hmoty 734,5; 748,5; 764,5 m/z u odtoku ČOV Brno – Modřice 28. 4. 2016

## 5. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo stanovení makrolidových antibiotik v odpadních vodách. Byla vybrána čtyři makrolidová antibiotika, a to azithromycin, klarithromycin, erythromycin a roxithromycin, které patří ze skupiny makrolidů k nejvíce používaným v ČR. Pro tyto účely musel být sestaven a optimalizován vhodný analytický postup, který by vedl k získání přesných a správných výsledků. K izolaci analytů z odpadní vody byla vybrána extrakce tuhrou fází (SPE) za použití optimalizovaného postupu s kolonkami Supel Select HLB 200 mg. Pro identifikaci a kvantifikaci byla zvolena metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS) za použití elektrospreje jako ionizační techniky a sférické iontové pasti jako analyzátoru.

Optimalizovaná metoda byla následně aplikována při analýze reálných vzorků. Ve dnech 19. až 29. 4. 2016 bylo provedeno desetidenní sledování koncentrace vybraných analytů na přítoku a odtoku ČOV Brno-Modřice. Dále byla ve dnech 20. a 27. 4. 2016 provedena analýza vzorků vody z přítoku a odtoku z ČOV Mikulov a dne 7. 4. 2016 z ČOV VFU Brno. Čistírny se od sebe liší jednak kapacitně a jednak v použité čisticí technologii. Společným znakem je zařazení biologického stupně čištění za použití aktivace. ČOV Mikulov má navíc zařazený terciární stupeň čištění pomocí bubnového mikrofiltru, ČOV VFU Brno má zase zařazenou chloraci s použitím volného chloru jako chloračního činidla.

Sledované analyty byly detekovány ve všech vzorcích z přítoků na ČOV a také, a to s výjimkou jednoho analytu v jednom vzorku, ve všech vzorcích z odtoků z ČOV. Nejvyšší koncentrace byly zjištěny u azithromycinu a klarithromycinu, erythromycin s roxithromycinem byly vesměs zastoupeny minoritně. Koncentrace se pohybovaly na hladinách jednotek ng/l až jednotek µg/l. Z naměřených dat byly vyhodnoceny účinnosti jednotlivých ČOV ve smyslu odstraňování vybraných makrolidových antibiotik z odpadní vody. Pro ČOV Brno-Modřice byla zjištěna průměrná účinnost v rozsahu 16–38 %, pro ČOV Mikulov 47–76 % a pro ČOV VFU Brno 50–100 %. Je proto pravděpodobné, že proces chlorace působí pozitivně při odstraňování těchto látek z vody. Otázkou však zůstává problematika produktů chlorace, které mohou nebo nemusí mít toxické účinky; odpadní voda (i voda po sekundárním čištění) je komplexní matricí, která obsahuje velké množství látek, a proto i identifikace všech možných produktů chlorace může být téměř nerealizovatelná. Z hlediska hrozícího vývoje bakteriální rezistence je však jednoznačně přínosné odstranění těchto látek z vody chlorací. Velice pozitivně se projevila také technologie zavedená na ČOV Mikulov. Technologický postup, zavedený na ČOV Brno-Modřice, poskytuje z hlediska eliminace makrolidových antibiotik z odpadní vody nejnižší účinnost.

Směr, kam by se měla posunout další práce, je jednoznačně zjištění, který z technologických stupňů čištění odpadní vody má za následek nejvyšší snížení koncentrace těchto látek, možnosti optimalizace procesu, vývoj, ověření a zavedení nových pokročilých technologií čištění a jejich zařazení do provozu. Ke komplexnějšímu posouzení účinnosti čisticího procesu by mělo být ještě provedeno stanovení koncentrace vybraných makrolidů v čistírenském kalu.



## 6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Zákon č. 378/2007 Sb., Zákon o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech). In: *Sbírka zákonů*. 6. 12. 2007. ISSN 1211-1244.
- [2] HAMPL, František, Stanislav RÁDL a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. 2., rozš. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007. ISBN 978-80-7080-639-5.
- [3] MANN, John. *Jedy, drogy, léky*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0508-0.
- [4] BOROEVANSKÝ, Alois a Jozef CSÖLLEI. *Farmaceutická chemie: (farmakochemie)*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2003. ISBN 80-730-5474-4.
- [5] Hodnocení distribuovaných a vydaných léčivých přípravků za rok 2015. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/hodnoceni-distribuovanych-a-vydanych-lecivych-pripravku-za>
- [6] LOCHMANN, Otto. *Antimikrobní terapie v praxi*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2006. ISBN 80-725-4826-3.
- [7] ANDERSON, Rosaleen J. Antibacterial agents: chemistry, mode of action, mechanisms of resistance, and clinical applications. Chichester: Wiley, 2012. ISBN 978-0-470-97245-8.
- [8] Gramovo barvení. In: *WikiSkripta* [online]. [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Gramovo\\_barven%C3%AD](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Gramovo_barven%C3%AD)
- [9] Types of Antibiotics: Bactericidal vs. Bacteriostatic & Narrow Spectrum vs. Broad Spectrum. *Study* [online]. [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: <http://study.com/academy/lesson/types-of-antibiotics-bacteriocidal-vs-bacteriostatic-narrow-spectrum-vs-broad-spectrum.html>
- [10] KOLLEF, Marin H. Broad-Spectrum Antimicrobials and the Treatment of Serious Bacterial Infections: Getting It Right Up Front. *Clinical Infectious Diseases*. 2008, 47(S1), S3-S13. DOI: 10.1086/590061. ISSN 1058-4838. Dostupné také z: <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/590061>
- [11] LINCOVÁ, Dagmar a Hassan FARGHALI. Základní a aplikovaná farmakologie. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2007. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [12] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Lutz HEIN. *Barevný atlas farmakologie*. Vyd. 4., české. Překlad Maxmilián Wenke. Ilustrace Jürgen Wirth. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3908-3.
- [13] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0836-1.
- [14] HAUSER, Alan R. *Antibiotic basics for clinicians: the ABCs of choosing the right antibacterial agent*. Second edition. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams, 2013. ISBN 978-145-1112-214.

- [15] Antimicrobial resistance. In: *World Health Organization* [online]. 2015 [cit. 2016-03-04]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>
- [16] Antibiotic resistance. In: *WHO Regional Office for Europe* [online]. 2016 [cit. 2016-03-04]. Dostupné z: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/antibiotic-resistance>
- [17] FINCH, R. G. *Antimicrobial chemotherapy*. 6th ed. Oxford: Oxford University Press, 2012. ISBN 978-0-19-969765-6.
- [18] The Resistant Bacteria Problem. In: *MeMed* [online]. 2015 [cit. 2016-03-04]. Dostupné z: [http://www.memed.com/html5/?\\_id=11489&did=2466&g=11051&title=the%20resistant%20bacteria%20prob](http://www.memed.com/html5/?_id=11489&did=2466&g=11051&title=the%20resistant%20bacteria%20prob)
- [19] SATOSKAR, R. S. *Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. Mumbai: Popular Prakashan, 2009. ISBN 9788179915271.
- [20] Overview of Pharmacokinetics. *The Merck Manuals* [online]. 2014 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z: <http://www.merckmanuals.com/professional/clinical-pharmacology/pharmacokinetics/overview-of-pharmacokinetics>
- [21] Drug Absorption. *The Merck Manuals* [online]. 2014 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z: <http://www.merckmanuals.com/professional/clinical-pharmacology/pharmacokinetics/drug-absorption>
- [22] <http://apbiomaedahs.weebly.com/2b-cell-homeostasis---cell-membrane-processes.html>
- [23] Drug Bioavailability. *The Merck Manuals* [online]. 2014 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z: <http://www.merckmanuals.com/professional/clinical-pharmacology/pharmacokinetics/drug-bioavailability>
- [24] Drug Distribution to Tissues. *The Merck Manuals* [online]. 2014 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z: <http://www.merckmanuals.com/professional/clinical-pharmacology/pharmacokinetics/drug-distribution-to-tissues>
- [25] Drug Metabolism. *The Merck Manuals* [online]. 2014 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z: <http://www.merckmanuals.com/professional/clinical-pharmacology/pharmacokinetics/drug-metabolism>
- [26] Drug Excretion. *The Merck Manuals* [online]. 2014 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z: <http://www.merckmanuals.com/professional/clinical-pharmacology/pharmacokinetics/drug-excretion>
- [27] How drugs are eliminated from the body. In: *Medscape: How drug interact: what clinicians need to know* [online]. 2014 [cit. 2014-04-21]. Dostupné z: [http://www.medscape.org/viewarticle/421137\\_1](http://www.medscape.org/viewarticle/421137_1)

- [28] DEO, Randhir a Rolf HALDEN. Pharmaceuticals in the Built and Natural Water Environment of the United States. *Water*. 2013, 5(3), 1346-1365. DOI: 10.3390/w5031346. ISSN 2073-4441. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2073-4441/5/3/1346/>
- [29] RHIANNON BRAUND AND BARRIE M. PEAKE. *The Life-cycle of Pharmaceuticals in the Environment*. Witney: Biohealthcare Pub, 2013. ISBN 978-190-7568-251.
- [30] Monitoring kvality kalů z ČOV a půd a rostlin po aplikaci kalů. In: *Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský* [online]. [cit. 2016-04-24]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/hnojiva-a-puda/bezpecnost-pudy/monitoring-vstupu-do-pudy/kontrola-kalu/>
- [31] HLAVÍNEK, Petr. FCH VUT BRNO. *Technologie čištění odpadních vod: Fyzikální procesy čištění OV*. Brno, 2015
- [32] HLAVÍNEK, Petr. FCH VUT BRNO. *Technologie čištění odpadních vod: Biologické čištění odpadních vod*. Brno, 2015
- [33] GUERRA, P., M. KIM, A. SHAH, M. ALAEE a S.A. SMYTH. Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes. *Science of The Total Environment*. 2014, 473-474, 235-243. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.008. ISSN 00489697. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969713014629>
- [34] LIN, Tao, Shilin YU a Wei CHEN. Occurrence, removal and risk assessment of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in an advanced drinking water treatment plant (ADWTP) around Taihu Lake in China. *Chemosphere*. 2016, 152, 1-9. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.02.109. ISSN 00456535. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653516302715>
- [35] SILVA, Carla Patrícia, Marta OTERO a Valdemar ESTEVES. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. *Environmental Pollution*. 2012, 165, 38-58. DOI: 10.1016/j.envpol.2012.02.002. ISSN 02697491. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749112000668>
- [36] LI, Bing a Tong ZHANG. Different removal behaviours of multiple trace antibiotics in municipal wastewater chlorination. *Water Research*. 2013, 47(9), 2970-2982. DOI: 10.1016/j.watres.2013.03.001. ISSN 00431354. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135413001577>
- [37] LIU, Chen, Venkateswarlu NANABOINA a KORSHIN. Spectroscopic study of the degradation of antibiotics and the generation of representative EfOM oxidation products in ozonated wastewater. *Chemosphere*. 2012, 86(8). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.11.003. ISSN 00456535. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653511012550>

- [38] LANGE, Franziska, Sjef CORNELISSEN, David KUBAC, et al. Degradation of macrolide antibiotics by ozone: A mechanistic case study with clarithromycin. *Chemosphere*. 2006, 65(1), 17-23. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.03.014. ISSN 00456535. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653506003110>
- [39] KANFER, Isadore, Michael F SKINNER a Roderick B WALKER. Analysis of macrolide antibiotics. *Journal of Chromatography A* [online]. 1998, (812), 255-286 [cit. 2015-12-09]. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00276-3. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967398002763>
- [40] HORIE, Masakazu, Harumi TAKEGAMI, Kazuo TOYA a Hiroyuki NAKAZAWA. Determination of macrolide antibiotics in meat and fish by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*[online]. 2003, 492(1-2), 187-197 [cit. 2016-01-29]. DOI: 10.1016/S0003-2670(03)00891-2. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267003008912>
- [41] Dodávky léčiv - se zaměřením na léčivé látky. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/rok-2015-1>
- [42] BERRADA, Houda, Francesc BORRULL, Guillermina FONT a Rosa Maria MARCÉ. Determination of macrolide antibiotics in meat and fish using pressurized liquid extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, 1208(1-2), 83-89 [cit. 2016-01-29]. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.08.107. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967308014088>
- [43] LANGE, Franziska, Sjef CORNELISSEN, David KUBAC, et al. Degradation of macrolide antibiotics by ozone: A mechanistic case study with clarithromycin. *Chemosphere* [online]. 2006, 65(1), 17-23 [cit. 2016-01-29]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.03.014. ISSN 00456535. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653506003110>
- [44] DING, Jie, Nanqi REN, Ligang CHEN a Lan DING. On-line coupling of solid-phase extraction to liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of macrolide antibiotics in environmental water. *Analytica Chimica Acta*[online]. 2009, 634(2), 215-221 [cit. 2016-01-29]. DOI: 10.1016/j.aca.2008.12.022. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267008021119>
- [45] LEAL, Carmen, Rosa CODONY, Ramon COMPAÑÓ, Mercè GRANADOS a M.Dolors PRAT. Determination of macrolide antibiotics by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2001, 910(2), 285-290 [cit. 2015-12-09]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)01231-0. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300012310>
- [46] ŌMURA, Satoshi. *Macrolide antibiotics: chemistry, biology, and practice*. 2nd ed. Boston: Academic Press, c2002. ISBN 01-252-6451-8.

- [47] O'NEIL, Maryadele J, (ed.). *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 14th ed. Editor Maryadele J O'Neil. Whitehouse Station, N.J.: Merck, 2006. ISBN 09-119-1000-X.
- [48] Erythromycin. *PubChem* [online]. 2010 [cit. 2016-04-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12560#section=Top>
- [49] Český lékopis 2009: (ČL 2009) = Pharmacopea bohemica MMIX : (Ph.B.MMIX). První vydání. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2994-7.
- [50] Erythromycin. *Toxnet* [online]. 2010 [cit. 2016-04-02]. Dostupné z: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+114-07-8:@odhsdb@/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~r7LOsE:3@>
- [51] Erythromycin. *PubChem* [online]. 2010 [cit. 2016-04-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12560#section=Top>
- [52] Databáze léků. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>
- [53] RUSSINSKY LIMITED. Derivatives of erythromycin, clarithromycin, roxithromycin or azithromycin with antibiotic and mucolytic activity. Německo. Patentový spis DE 69915327 T1. 3. 3. 2004.
- [54] BAUMANN, Michaela, Klaus WEISS, Dirk MALETZKI, Walter SCHÜSSLER, Dieter SCHUDOMA, Willi KOPF a Ute KÜHNEN. Aquatic toxicity of the macrolide antibiotic clarithromycin and its metabolites. *Chemosphere*. 2015, 120, 192-198. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.05.089. ISSN 00456535. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653514007413>
- [55] Clarithromycin. *Toxnet* [online]. 2012 [cit. 2016-04-02]. Dostupné z: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?/temp/~BGbvWP:5>
- [56] Clarithromycin. *PubChem* [online]. 2009 [cit. 2016-04-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/84029>
- [57] Roxithromycin. *DrugBank* [online]. 2014 [cit. 2016-04-02]. Dostupné z: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00778>
- [58] Roxithromycin. In: *ChemSpider* [online]. [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.392060.html>
- [59] Azithromycin. In: *Toxnet* [online]. 2013 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+83905-01-5>
- [60] Azithromycin. *PubChem* [online]. 2014 [cit. 2016-04-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/447043#section=Top>

- [61] FICBAUER, Vít. *Hodnocení environmentálních rizik*. Brno, 2009. Dizertační práce. VUT Brno.
- [62] HARRIS, Daniel C. *Quantitative chemical analysis*. 4th ed. New York: W.H. Freeman, 1995. ISBN 07-167-2508-8.
- [63] HORÁLEK, Vratislav. *Vzorkování I: obecné zásady*. Český Těšín: 2 Theta, 2010. ISBN 978-80-86380-53-7.
- [64] HELÁN, Václav (ed.). *Odběry vzorků: sborník přednášek z kurzu*. Český Těšín: 2 THETA, 2003. Analytical standards and equipment. ISBN 80-863-8018-1.
- [65] ŠEVČÍK, Jiří Georg Kamil. *Měření a výsledky v analytické chemii*. Český Těšín: 2 Theta, 2009. ISBN 978-80-86380-48-3.
- [66] PAWLISZYN, Janusz a Heather L. LORD (eds.). *Comprehensive sampling and sample preparation: analytical techniques for scientists*. Amsterdam: Elsevier, c2012. ISBN 978-0-12-381373-2.
- [67] *Guide to solid phase extraction* [online]. [cit. 2016-05-04]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
- [68] *Beginner's Guide to SPE* [online]. [cit. 2016-05-04]. Dostupné z: [https://waters.com/waters/en\\_US/Beginner's-Guide-to-SPE-%5BSolid-Phase-Extraction%5D/nav.htm?cid=134721476](https://waters.com/waters/en_US/Beginner's-Guide-to-SPE-%5BSolid-Phase-Extraction%5D/nav.htm?cid=134721476)
- [69] ROUESSAC, Francis a Annick ROUESSAC. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. 2nd ed. Chichester: John Wiley, 2007. ISBN 9780470859032.
- [70] *Solid phase extraction products* [online]. 2015. [cit. 2016-05-04]. Dostupné z: [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General\\_Information/t402150.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General_Information/t402150.pdf)
- [71] *Solid phase extraction application guide* [online]. [cit. 2016-05-04]. Dostupné z: [ftp://ftp.mn-net.com/english/Flyer\\_Catalogs/Chromatography/SPE/SPE\\_Applis.pdf](ftp://ftp.mn-net.com/english/Flyer_Catalogs/Chromatography/SPE/SPE_Applis.pdf)
- [72] GÜNZLER, Helmut a Alex WILLIAMS. *Handbook of analytical techniques*. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. ISBN 3527301658.
- [73] VOLKA, Karel, Jaroslav FOGL, Milan POPL a Miloslav SUCHÁNEK. *Analytická chemie II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1997. ISBN 8070802278.
- [74] HARRIS, Daniel C. *Exploring chemical analysis*. New York: W.H. Freeman and Co., 1997. ISBN 07-167-3042-1.

- [75] TOPOLEWSKA, Anna, Karolina CZARNOWSKA, Łukasz P. HALIŃSKI a Piotr STEPNOWSKI. Evaluation of four derivatization methods for the analysis of fatty acids from green leafy vegetables by gas chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2015, 990, 150-157. DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.03.020. ISSN 15700232. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023215001890>
- [76] SKOOG, Douglas A. a James J. LEARY. *Principles of instrumental analysis*. 4th ed. Fort Worth: Harcourt Brace College Publishers, 1992. ISBN 0030753988.
- [77] MOLDOVEANU, Serban C. a Victor DAVID. *Essentials in modern HPLC separations*. Waltham, MA: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-385013-3.
- [78] SWADESH, Joel K. *HPLC: practical and industrial applications*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. ISBN 0849300037.
- [79] FANALI, Salvatore a Victor DAVID. *Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation*. Waltham: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-415807-8.
- [80] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [81] BUDDE, William L. *Analytical mass spectrometry: strategies for environmental and related applications*. Washington: American Chemical Society, 2001. ISBN 084123664X.
- [82] Ascentis® Express Columns for Fast HPLC. In: *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=17841436>
- [83] Kinetex 1.7 µm Core-Shell Technology. In: *Phenomenex* [online]. 2011 [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/ef8950ec-aa2c-4c78-919b-18e3c432b638.pdf>
- [84] HPLC Center. In: *IDEX: Health & Science* [online]. [cit. 2016-05-06]. Dostupné z: <https://www.idex-hs.com/education-and-tools/educational-materials/hplc-center>
- [85] Performance characteristics of the Agilent 1290 Infinity Diode Array Detector. In: Agilent Technologies [online]. [cit. 2016-05-11]. Dostupné z: <http://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5990-5601EN.pdf>
- [86] MERMET, Jean-Michel, Matthias OTTO a Miguel VALCÁRCEL. *Analytical chemistry: a modern approach to analytical science*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2004. ISBN 3527305904.
- [87] BARKER, James. *Mass spectrometry*. 2nd ed. Chichester: John Willey, 1999. ISBN 0471967629.
- [88] SÝKORA, R. *Využití GC/MS při analýze léčiv*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 69 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc..

- [89] Experimentální metody strukturálního výzkumu. In: *Univerzita Pardubice* [online]. [cit. 2016-05-11]. Dostupné z: [http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek\\_EMSV\\_MS.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek_EMSV_MS.pdf)
- [90] MCLAFFERTY, Fred W. a František TUREČEK. *Interpretation of mass spectra*. 4th ed. Mill Valley: University Science Books, 1993. ISBN 0935702253.
- [91] Concepts Guide: Agilent 6300 Ion Trap LC/MS Systems. In: *Agilent Technologies* [online]. [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: [http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G2440-90096\\_Concepts\\_6.1.pdf](http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G2440-90096_Concepts_6.1.pdf)
- [92] ČÁSLAVSKÝ, Josef. FCH VUT BRNO. *Hmotnostní spektrometrie: Analyzátory*. Brno, 2015
- [93] Resolving Power and Mass Resolution. In: *Agilent Technologies* [online]. [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <http://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5991-5885EN.pdf>
- [94] An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 1997, 1997(32), 351-369 [cit. 2016-05-11]. Dostupné z: [http://www.wiley.com/legacy/wileychi/ms/articles/351\\_a.pdf](http://www.wiley.com/legacy/wileychi/ms/articles/351_a.pdf)
- [95] A diagrammatic representation of an ion trap. In: *NPTEL* [online]. [cit. 2016-05-11]. Dostupné z: <http://nptel.ac.in/courses/102103044/module2/lec12/5.html>
- [96] LISÁ, H. *Problematika stanovení reziduí léčiv v odpadních vodách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 145 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
- [97] Kanalizační řád včetně mapových podkladů: Kanalizační řád pro statutární město Brno, město Kuřim, město Modřice, obce Česká a Želešice. In: *Brněnské vodárny a kanalizace* [online]. [cit. 2016-05-07]. Dostupné z: <http://www.bvk.cz/zakaznikum/podminky-dodavky-vody-a-odvadeni-vod-odpadnich/kanalizacni-rad-vcetne-mapovych-podkladu/>
- [98] ČOV Brno - Modřice: ČOV Modřice - technický popis. In: *Brněnské vodárny a kanalizace* [online]. [cit. 2016-05-07]. Dostupné z: <http://www.bvk.cz/o-spolecnosti/odvadeni-a-cistení-odpadnich-vod/cov-brno-modrice/>
- [99] Dokumenty a formuláře: Kanalizační řád - Mikulov. In: *Vodovody a kanalizace Břeclav* [online]. [cit. 2016-05-07]. Dostupné z: <http://www.vak-bv.cz/o-spolecnosti/dokumenty-a-formulare/>
- [100] Břeclavsko – rekonstrukce a výstavba vodohospodářské infrastruktury v povodí řeky Dyje: Zadávací dokumentace stavby, stavba 2A Mikulov – ČOV. Břeclav, 2005.
- [101] Bulletin 932: Discovery Zr: Method Development Guidelines. In: *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2016-05-07]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/11700/11603.pdf>



[102] Kinetex: Column Care and Optimization Notes. In: *Phenomenex* [online]. [cit. 2016-05-07]. Dostupné z:

[http://www.phenomenex.com/Info/WebDocumentServe/il69770315\\_w\\_care.pdf](http://www.phenomenex.com/Info/WebDocumentServe/il69770315_w_care.pdf)

[103] Ascentis® Express HILIC Guide. In: *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2016-05-07].

Dostupné z: [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General\\_Information/1/t412061.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General_Information/1/t412061.pdf)

[104] DADÁKOVÁ, P. *Sledování obsahu sulfonamidů v odpadních vodách z čistíren odpadních vod s různými technologiemi čištění*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 79 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

[105] SWARTZ, Michael a Ira S. KRULL. *Handbook of analytical validation*. Boca Raton: CRC Press, c2012. ISBN 978-0-8247-0689-0.

[106] ŠVESTKOVÁ, T. *Stanovení lineárních syntetických vonných látek v abiotických a biotických matricích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 116 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK a SYMBOLŮ

ACN	acetonitril
APCI	ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BCF	biokoncentrační faktor
BSK <sub>5</sub>	biologická spotřeba kyslíku za 5 dní
ČOV	čistírna odpadních vod
DAD	detektor s diodovým polem
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELSD	evaporative light scattering detector
EPA	agentura pro ochranu životního prostředí
ESI	ionizace elektrosprejem
FLD	Fluorescenční detektor
FTIR	infračervená spektroskopie s fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
GIT	gastrointestinální trakt
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LLE	extrakce kapalina/kapalina
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MF	mobilní fáze
MIP	molekulárně vtištěný polymer
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	hmotnostní spektrometrie
NL	nerozpuštěné látky
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NSAID	Nesteroidní protizánětlivé látky
PABA	kyselina paraaminobenzoová
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PE	polyethylen
PTFE	polytetrafluorethylen
SF	Stacionární fáze
SPE	extrakce tuhou fází
RID	Refraktometrický detektor
RNA	ribonukleová kyselina
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření
WWTP	wastewater treatment plant (čistírna odpadních vod)
ŽP	životní prostředí

## **8. SEZNAM PŘÍLOH**

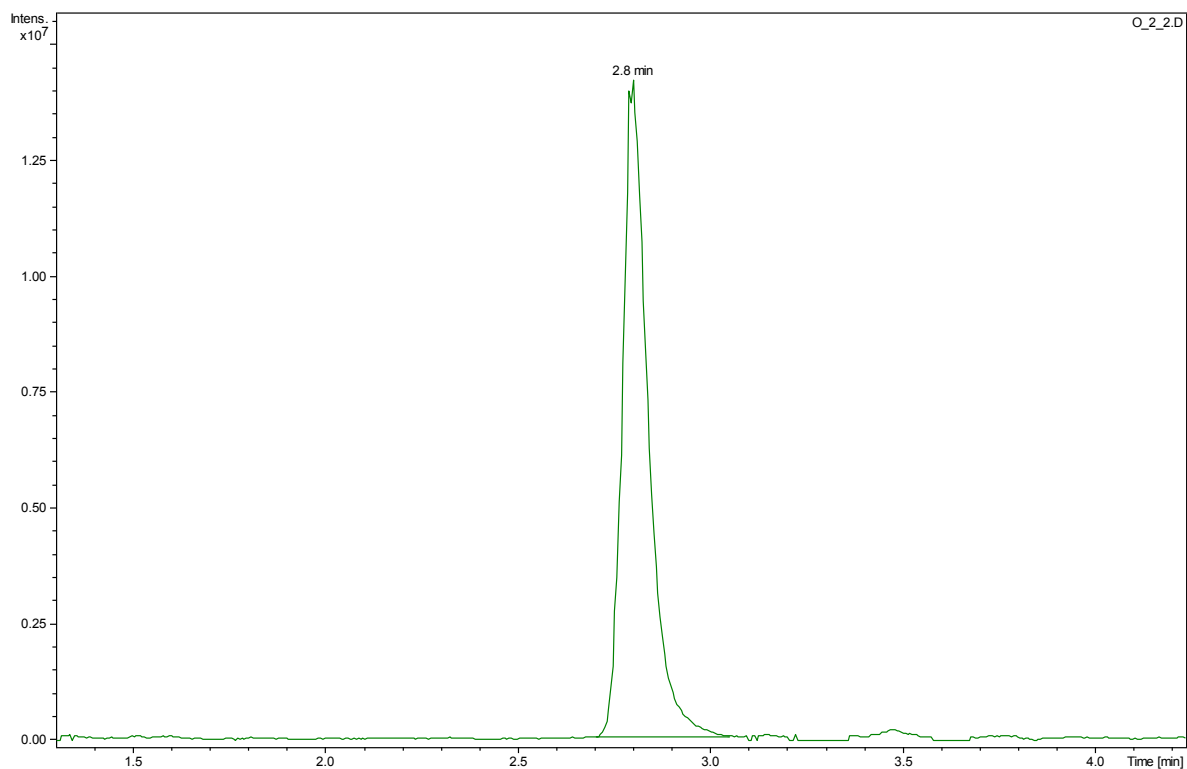
Příloha č. 1: Extrahované iontové chromatogramy sledovaných analytů z odtoků nebo přítoků na ČOV

Příloha č. 2: Metabolity klarithromycinu

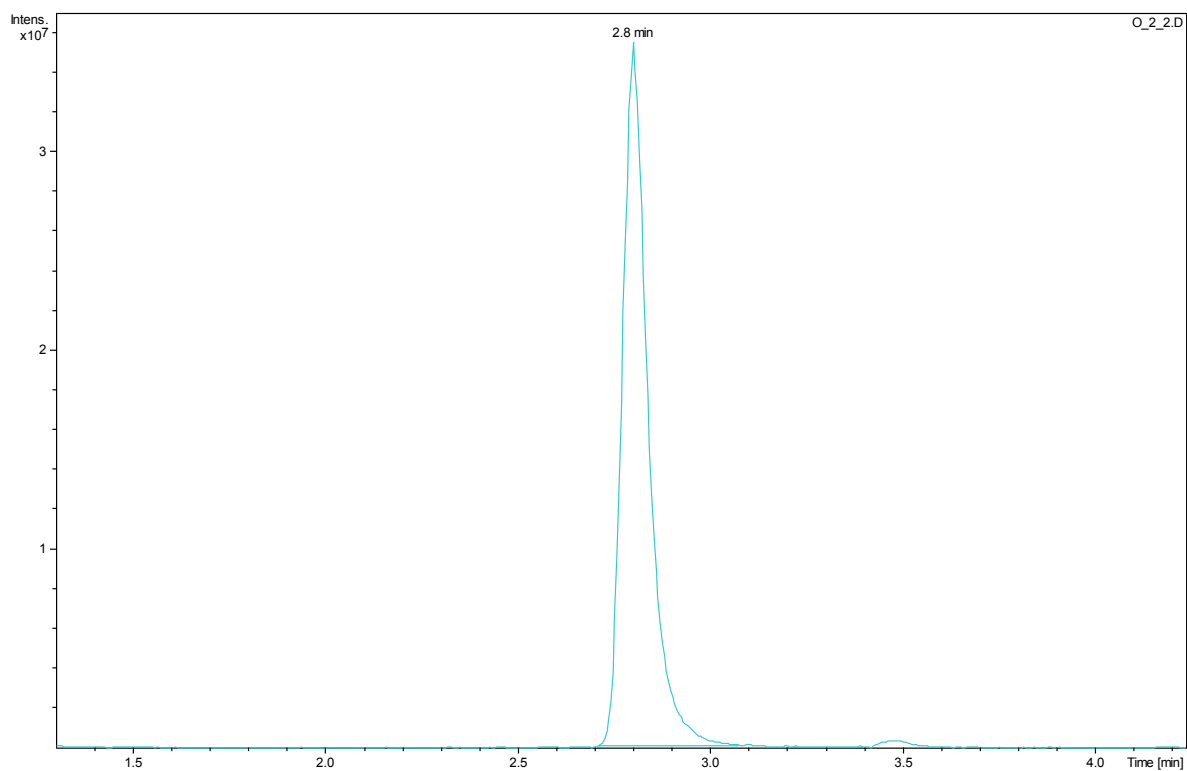
Příloha č. 3: Přístrojové vybavení

Příloha č. 4: Fotografie ČOV

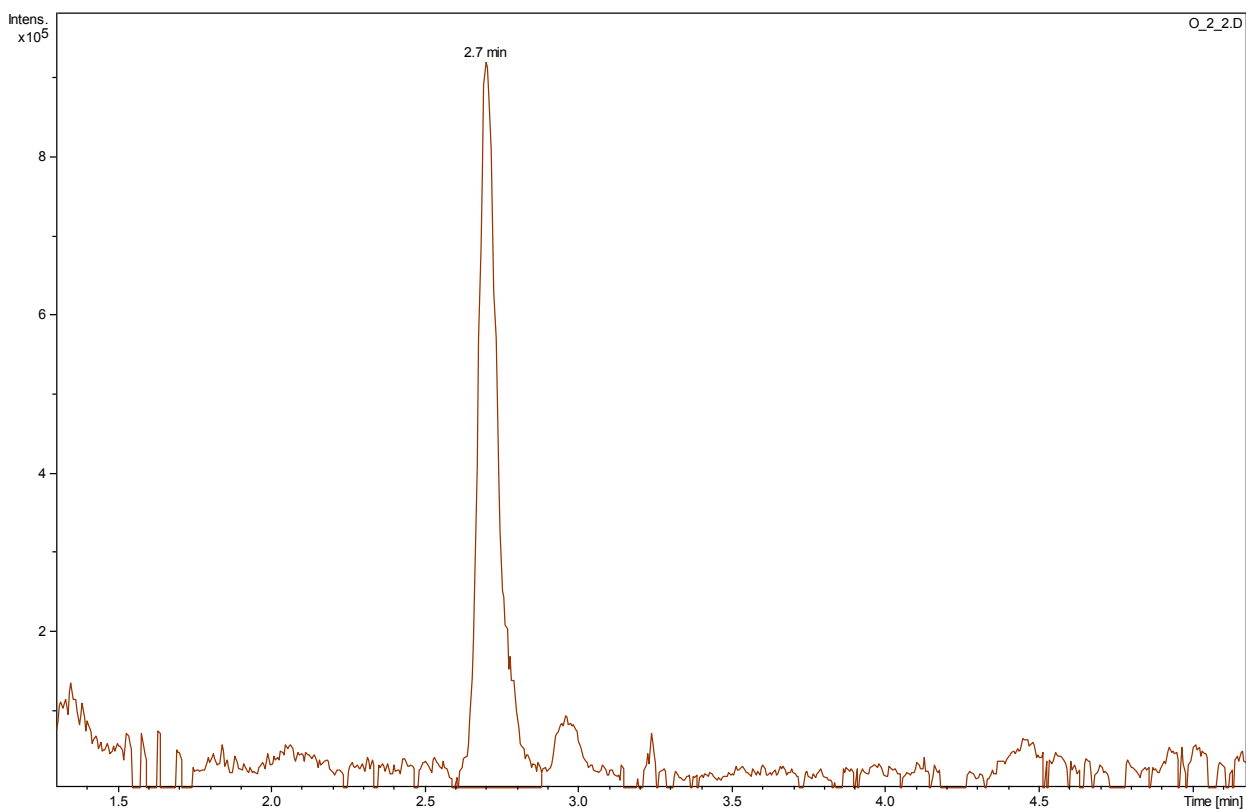
Příloha č. 1: Extrahované iontové chromatogramy sledovaných analytů z odtoků nebo přítoků na ČOV



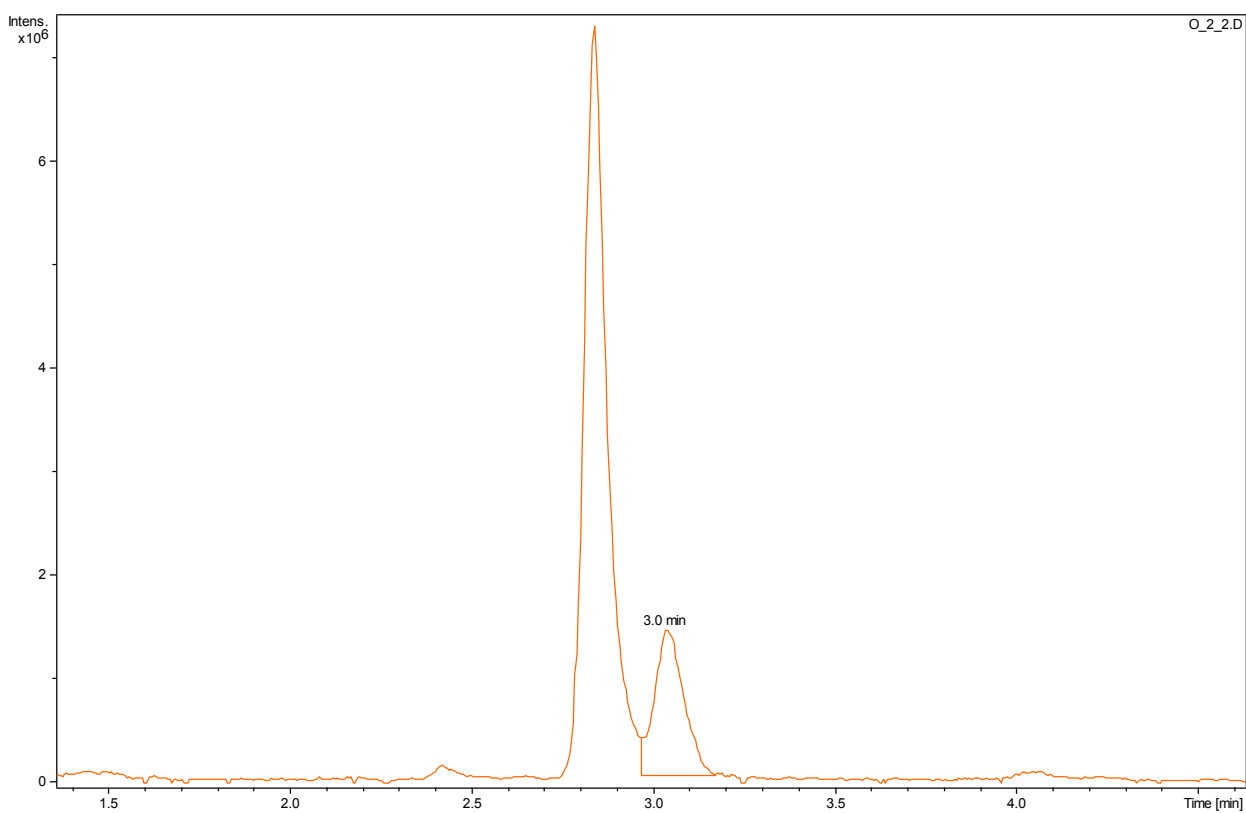
Obrázek č. 33: Extrahovaný iontový chromatogram azithromycinu z odtoku ČOV Brno – Modřice ze dne 28. 4. 2016



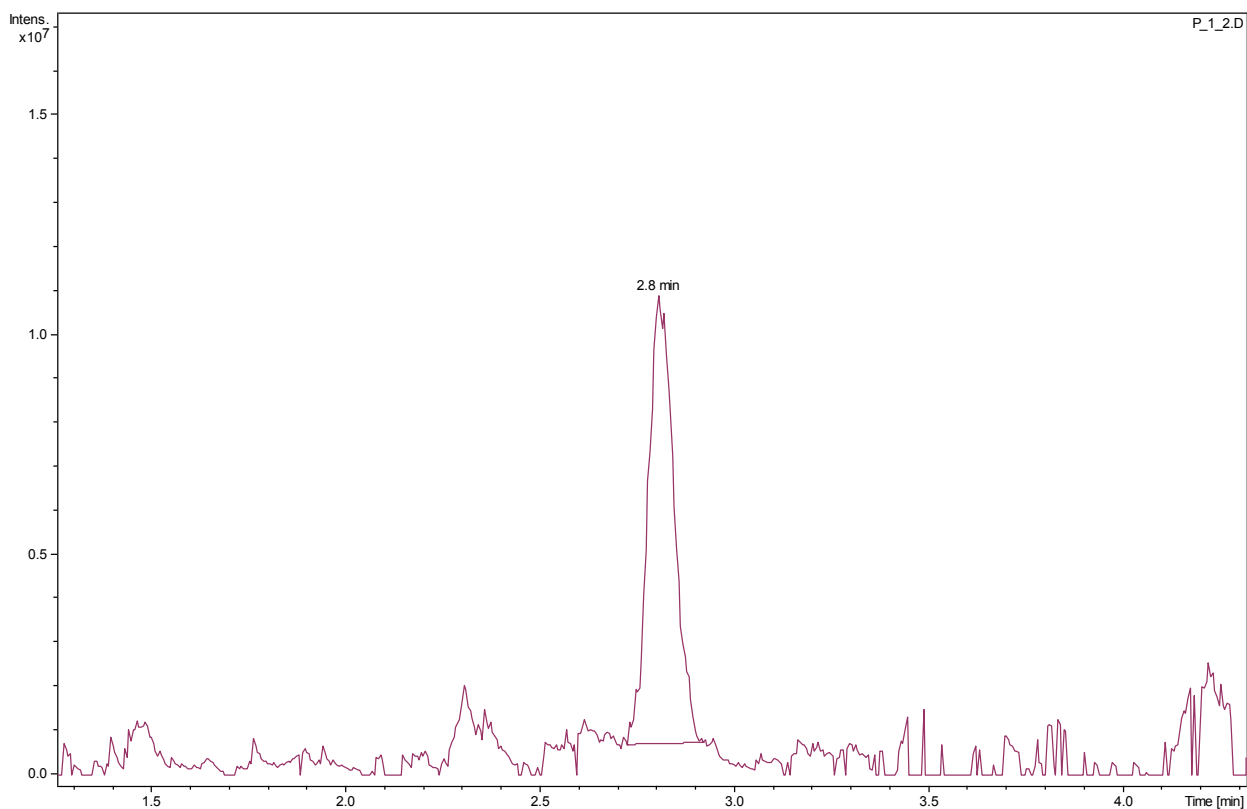
Obrázek č. 34: Extrahovaný iontový chromatogram klarythromycinu z odtoku ČOV Brno – Modřice ze dne 28. 4. 2016



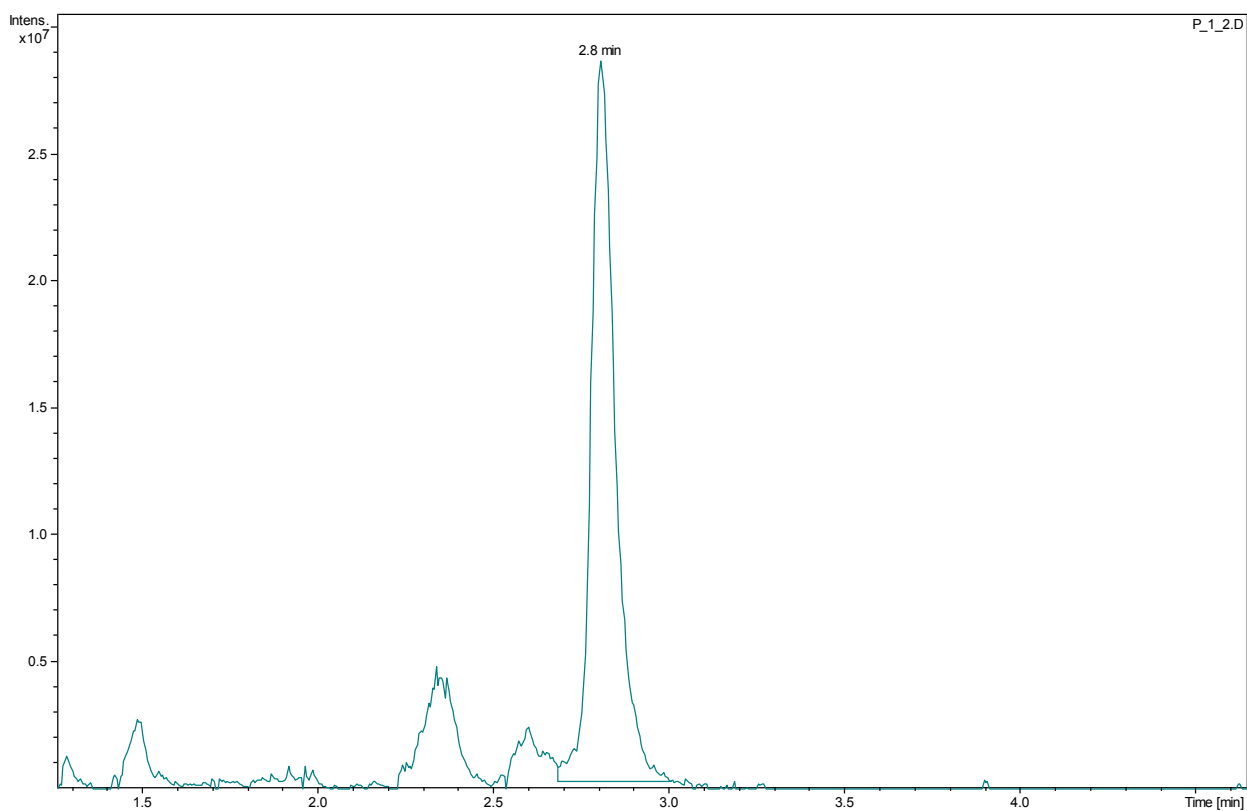
Obrázek č. 35: Extrahovaný iontový chromatogram roxithromycinu z odtoku ČOV Brno – Modřice ze dne 28. 4. 2016



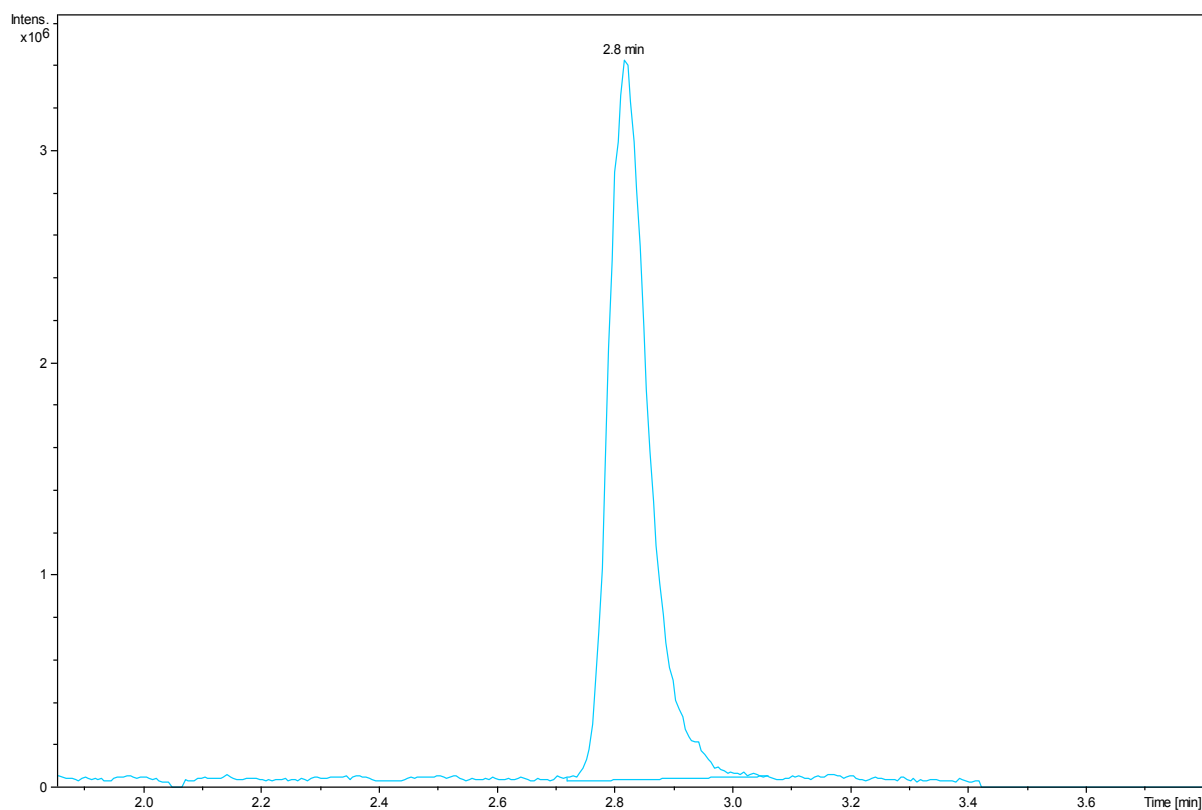
Obrázek č.. 36: Extrahovaný iontový chromatogram erythromycinu z odtoku ČOV Brno – Modřice ze dne 28. 4. 2016



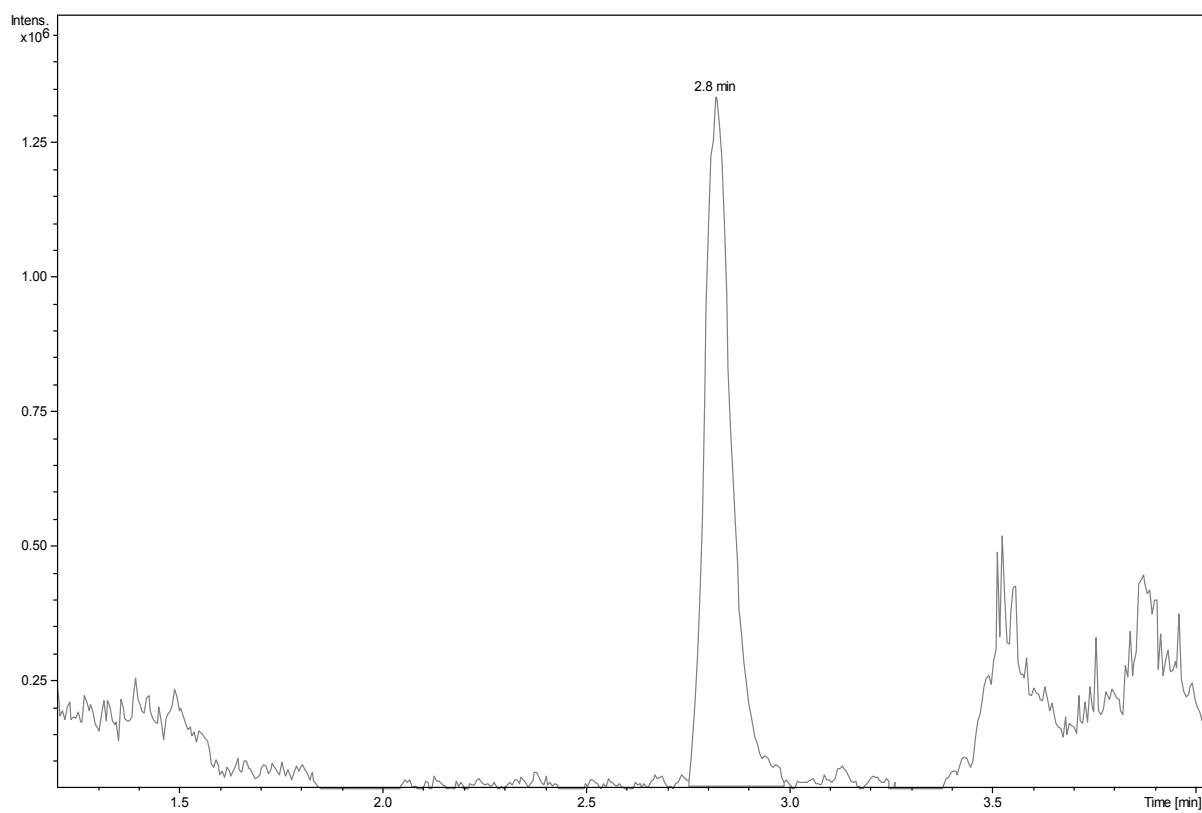
Obrázek č. 37: Extrahovaný iontový chromatogram azithromycinu z přítoku ČOV Brno – Modřice ze dne 28. 4. 2016



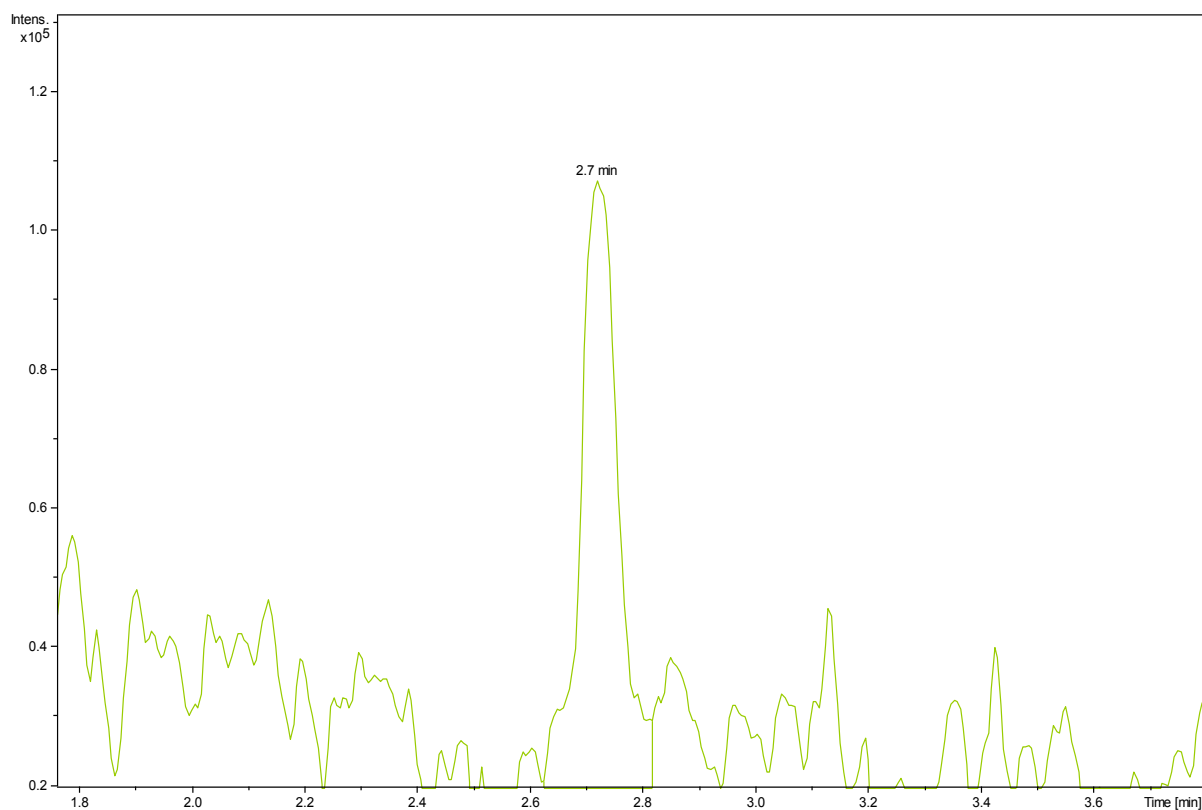
Obrázek č. 38: Extrahovaný iontový chromatogram klarythromycinu z přítoku ČOV Brno – Modřice ze dne 28. 4. 2016



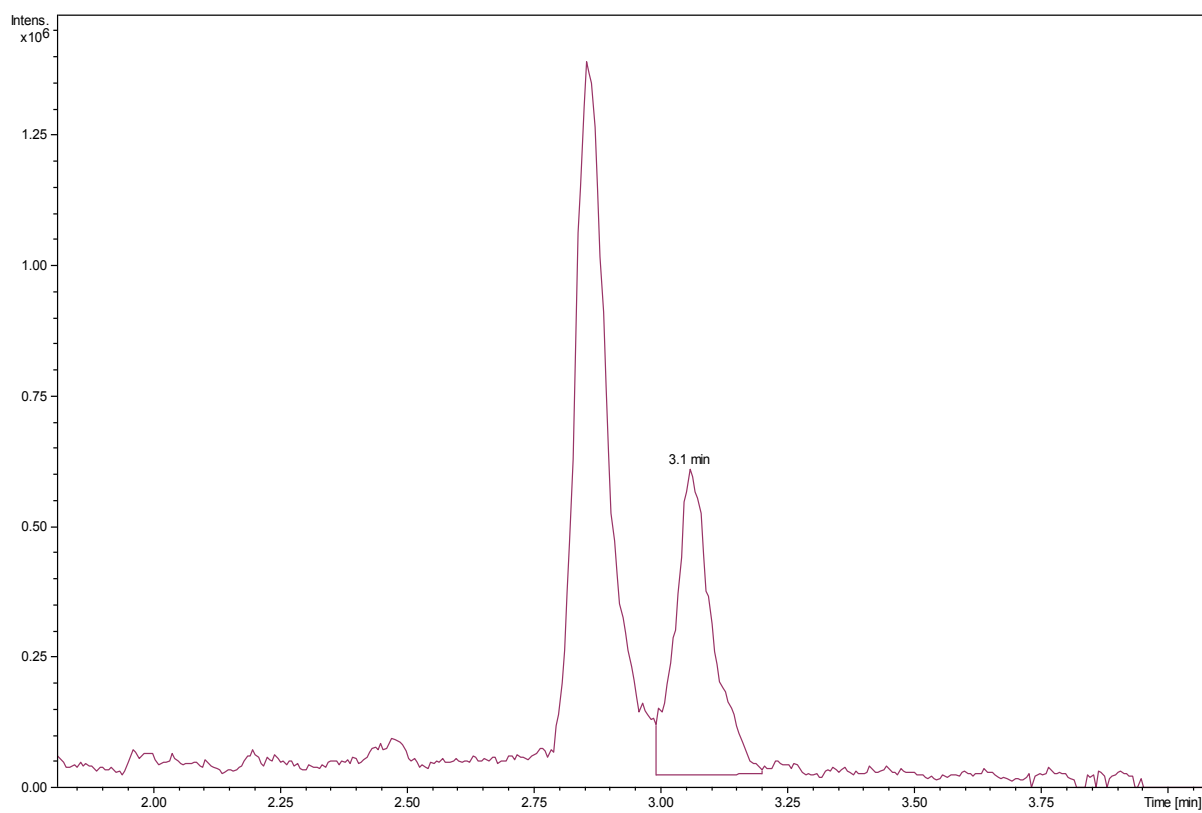
Obrázek č. 39: Extrahovaný iontový chromatogram klarythromycinu z odtoku ČOV Mikulov ze dne 27. 4. 2016



Obrázek č. 40: Extrahovaný iontový chromatogram azithromycinu odtoku ČOV Mikulov ze dne 27. 4. 2016



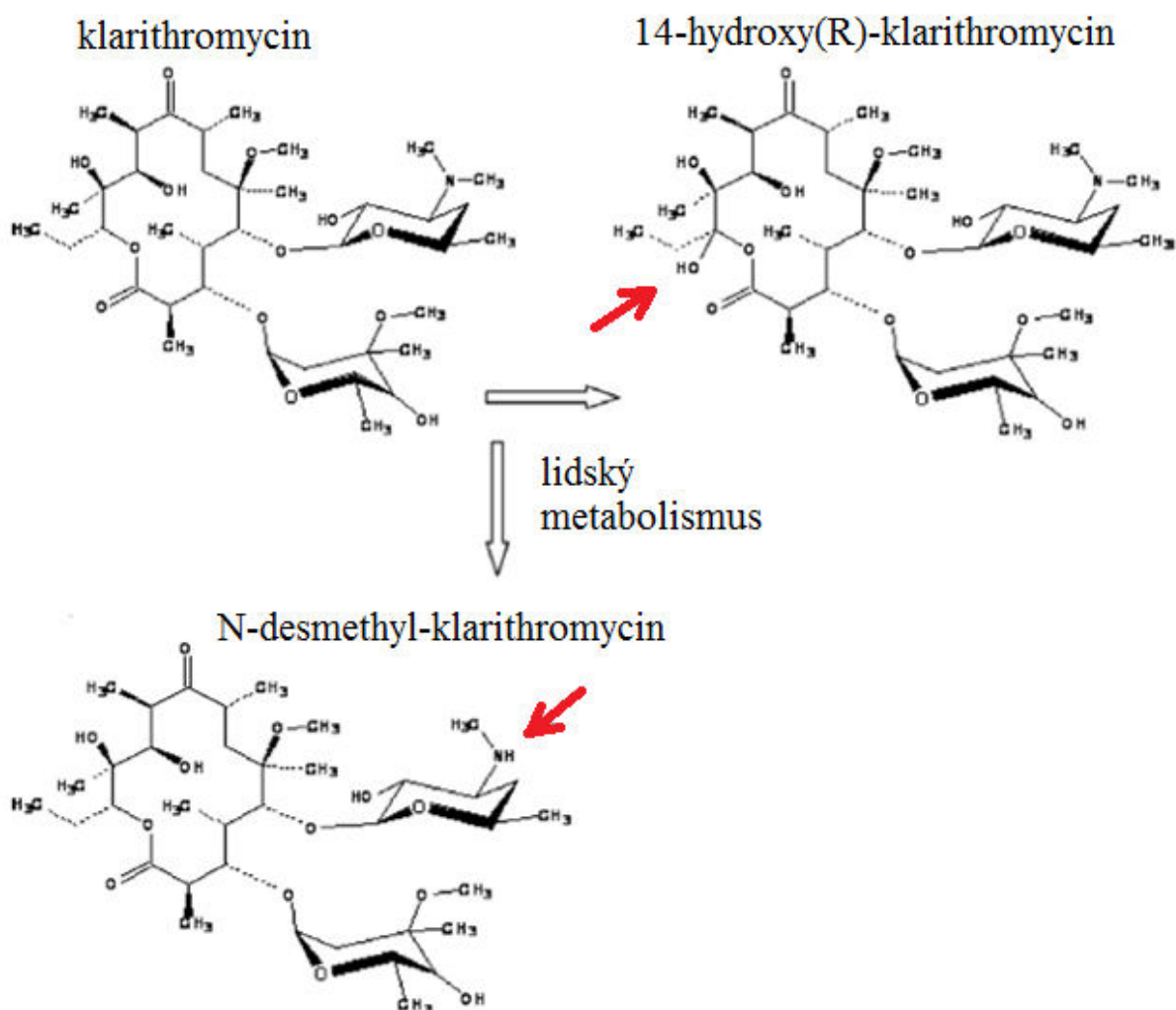
Obrázek č. 41: Extrahovaný iontový chromatogram roxithromycinu z odtoku ČOV Mikulov ze dne 27. 4. 2016



Obrázek č. 42: Extrahovaný iontový chromatogram erythromycinu z odtoku ČOV Mikulov ze dne 27. 4. 2016



Příloha č. 2: Metabolity klarithromycinu



Obrázek č. 43: Chemická struktura dvou hlavních metabolitů klarithromycinu [54]

Příloha č. 3: Přístrojové vybavení



Obrázek č. 44: Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series a hmotnostní spektrometr Agilent 6320 Series IonTrap

Příloha č. 4: Fotografie ČOV



*Obrázek č. 45: Letecký pohled na areál ČOV Brno – Modřice [106]*